

Humboldt - Universität zu Berlin

Dissertation

Sauerstoffabhängige Regulation der Selenoproteinbiosynthese

zur Erlangung des Akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I

M.Sc. Niels-Peter Becker

Dekan: Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Lutz Schomburg

2. Prof. Dr. Werner Kloas

3. Prof. Dr. Ulrich Schweizer

Datum der Einreichung: 05.02.2015

Datum der Promotion: 06.05.2015

Zusammenfassung

Das essentielle Spurenelement Selen (Se) wird als Selenocystein (Sec) in sog. Selenoproteine eingebaut. Die Biosynthese und der zielgerichtete Einbau von Sec verbraucht Energie und erfordert das koordinierte Zusammenspiel mehrerer Enzyme und Translationsfaktoren. Selenoproteine haben aufgrund von Sec besondere Eigenschaften und eine Reihe von wichtigen Funktionen im Körper; sie regulieren den Schilddrüsenhormonmetabolismus, die Redoxhomöostase und sind an der Qualitätskontrolle falsch gefalteter Proteine im endoplasmatischen Retikulum beteiligt. Im Menschen führt starker Se-mangel zu degenerativen Knorpelerkrankungen und stellt einen Risikofaktor für die Entwicklung von Krebs, Entzündungen, kognitiven Verfall, Schlaganfall und Schilddrüsenerkrankungen dar.

Hypoxie tritt ebenfalls in einer Vielzahl schwerer Erkrankungen wie Krebs, Sepsis oder Trauma auf. Auf zellulärer Ebene wird die Hypoxieantwort über Transkriptionsfaktoren aus der HIF-Familie („Hypoxia-Inducible Factor“) vermittelt. Die Leber ist das zentrale Organ des Selenmetabolismus. Hier wird über die Nahrung aufgenommenes Selen in organisches Sec umgewandelt und in Form von Selenoprotein P (SePP) dem Körper zur Verfügung gestellt. Die Hypothese dieser Arbeit war, dass Hypoxie die Selenoproteinbiosynthese beeinflusst. Experimentell induzierte Hypoxie führte in humanen hepatokarzinomen Zellen zu einer verminderten Expression fast aller Selenoproteinen bis auf die für Überleben und Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies wichtige membranständige Glutathion Peroxidase 4 (GPX4), welche auch unter hypoxischen Bedingungen stabil exprimiert wurde. Diese Umverteilung von Sec, weg von der Biosynthese des sezernierten SePP hin zur intrazellulären GPX4, wurde HIF unabhängig vermittelt. Stattdessen wurde die *GPX4* mRNA stark induziert und gleichzeitig wurden Schlüsselenzyme der Sec-Biosynthese spezifisch herunterreguliert.

Mesenchymale Stammzellen (MSC) leben im Körper unter hypoxischen Bedingungen und haben aufgrund Ihrer Plastizität ein großes regeneratives Potential. In diesem Zellmodel führte nicht Hypoxie, sondern Se-Supplementation, zu einer Herunterregulation der Sec oder Selenoproteinbiosynthese. Dieser Effekt dürfte für die Proliferationskapazität der MSC essentiell sein.

In dieser Arbeit werden diese Ergebnisse vorgestellt und vor dem Hintergrund einer Studie zu Se-Spiegeln bei Patienten mit Polytrauma diskutiert. Außerdem wird ein Ausblick auf eine klinische Studie zu Spurenelementen bei Neugeborenen mit Infektion gegeben.

Abstract

The essential trace element Selenium (Se) is incorporated into proteins, so called selenoproteins, in form of the 21st proteinogenic amino acid selenocysteine (Sec). Sec biosynthesis and its site-directed insertion into the growing protein are energy consuming processes and require the interplay of various enzymes and a set of specific translation factors. Due to the unique biochemical characteristics of Sec, selenoproteins fulfill a number of important functions within the body, including the regulation of thyroid hormone metabolism, intracellular redox homeostasis or quality control of newly synthesized proteins within the endoplasmic reticulum. In humans, a profound Se deficiency predisposes to a degenerative cartilage disease and moderate Se deficiency constitutes a risk factor for a variety of diseases, such as cancer, inflammation, cognitive decline, stroke or thyroid diseases.

Hypoxia occurs in a number of severe illnesses, e.g. in cancer, sepsis or trauma. The cellular transcriptional response is mediated via „Hypoxia inducible factors“ (HIF). The liver is the central organ of Se metabolism, where dietary Se is organified to Sec and distributed in form of selenoprotein P (SePP) throughout the body. This thesis tested the hypothesis that hypoxia may directly affect selenoprotein biosynthesis. In human hepatocarcinoma cells, an experimentally-induced hypoxia led to a reduction of almost all selenoproteins analyzed, with the notable exception of Glutathione Peroxidase, type 4 (GPX4). The enzyme GPX4, important for neutralizing lipid hydroperoxides, remained stably expressed under hypoxic conditions. This redistribution of Sec, away from the secreted Se transporter SePP towards the intracellular protective enzyme GPX4, was HIF independent and rather a result of *GPX4* mRNA induction and down-regulation of key enzymes at the bottleneck of Sec biosynthesis.

Mesenchymal stem cells (MSC) survive in the human body in a hypoxic niche. Due to their great plasticity, MSC have a huge regenerative potential. In this cell model, it was not hypoxia, but rather Se supply itself, which led to a coordinated down-regulation of the whole Sec biosynthesis machinery causing diminished selenoprotein biosynthesis.

In this thesis these results are presented and discussed in light of a clinical trial on the importance of Se in polytraumatic patients. Further, an outlook on a clinical trial to elucidate the role of trace elements during neonatal infections is given.

Schlagwörter: Selen, Hypoxia, Mesenchymale Stammzellen, Neonatale Sepsis

Key words: selenium, hypoxia, mesenchymal stem cells, neonatal sepsis

Inhaltsverzeichnis:

Zusammenfassung	2
Abstract	4
Inhaltsverzeichnis:.....	6
Widmung	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1. Einleitung	14
1.1 Das Element Selen in der Umwelt und im Menschen.....	14
1.2 Die Biologie der Selenoproteine	18
1.2.1 Sec-Biosynthese	19
1.2.1.1 Phosphoseryl tRNA[Ser]Sec Kinase	20
1.2.1.2 SeptRNA:SectRNA Synthase	20
1.2.1.3 Selenophosphat Synthetase 2	20
1.2.2 Einbau von Sec in Selenoprotein mRNA	21
1.2.3 Aminoglykoside	22
1.3 Einteilung und Funktion von Selenoproteine.....	22
1.3.1 Dejodasen	23
1.3.2 Glutathion Peroxidasen	23
1.3.3 Thioredoxin Reduktasen	24
1.3.4 Selenoprotein P	25
1.3.5 Selenoprotein S	25
1.3.6 Selenoprotein N.....	26
1.3.7 Andere Selenoproteine und Sec-Recycling.....	26
1.3.8 Selenbindende Proteine	26
1.4 Se und die Gesundheit des Menschen	27
1.5 Sauerstoffregulation in der Zelle und im menschlichen Körper	29
2. Material und Methoden	32
2.1 Material	32
2.1.1 Chemikalien, Plastikware und Enzyme.....	32
2.1.2 Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien	32
2.1.3 Plasmide	32
2.1.4 Synthetisierte Oligonukleotide	33
2.1.5 Gebrauchswaren /Geräte	33
2.1.6 Software und Datenbanken	35
2.1.7 Hepatisches Karzinommodell	35
2.2 Methoden.....	36
2.2.1 Probengewinnung und Lagerung	36

2.2.1.1	RNA Isolation	36
2.2.1.2	DNA Plasmid Isolation	36
2.2.1.3	Proteingewinnung.....	37
2.2.1.3.1	Differentielle Zentrifugation	37
2.2.1.3.2	Proteine für enzymatische Assays.....	37
2.2.1.4	Mäuse Serum.....	37
2.2.2	Molekulargenetische Methoden	38
2.2.2.1	qPCR	38
2.2.2.1.1	Primer Design.....	38
2.2.2.1.2	cDNA Synthese	38
2.2.2.1.3	qPCR/Real-Time PCR.....	38
2.2.2.2	Klonierung.....	39
2.2.2.2.1	Promotersequenzklonierung aus genomischer DNA	39
2.2.2.2.2	Umklonierung von HIF1 und HIF2 Plasmiden	40
2.2.2.2.3	DNA Agarosegel Aufreinigung	40
2.2.2.2.4	DNA Ligation.....	40
2.2.2.2.5	Transformation von chemisch-kompetenten Zellen.....	41
2.2.2.3	Sequenzierungen	41
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	41
2.2.3.1	Proteinbestimmungen mittels Bradford oder BCA Assay	41
2.2.3.2	Western Blot Analyse.....	42
2.2.3.2.1	Polyacrylamid SDS-Gelelektrophorese.....	42
2.2.3.2.2	Protein Transfer und Blockierung	42
2.2.3.2.3	Immundetektion	43
2.2.3.3	SePP ELISA	44
2.2.3.4	GPX Enzymassay	44
2.2.3.5	Deiodase Enzym Assay	44
2.2.4	Se/Spurenelement Messung mittels TXRF	45
2.2.5	Zellkultur	46
2.2.5.1	Stammhaltung und Stimulation.....	46
2.2.5.2	Plasmid Transfektion in Säugerzellen.....	46
2.2.5.3	Reportengenassay	46
2.3	Statistik.....	47
3.	Ergebnisse	48
3.1	Regulation von Selenoproteinen und der Selenoproteinbiosynthese durch Hypoxie ..	48
3.1.1	Hypoxie Nachweis in vitro.....	48
3.1.2	SePP wird durch Hypoxie reguliert.....	49
3.1.3	Regulation der DIO 1 durch Hypoxie	51

3.1.4	SelS wird durch Hypoxie reguliert.....	52
3.1.5	Glutathion Peroxidasen werden differentiell durch Hypoxie reguliert	52
3.1.6	Regulation anderer Selenoprotein Transkripte durch Hypoxie.....	55
3.1.7	Regulation der SECIS abhängigen Sec Insertion durch Hypoxie	56
3.1.8	Regulation von SePP und GPX4 durch HIF	57
3.1.9	Einfluss von hepatischem Hif knock-out <i>in-vivo</i>	58
3.1.10	Regulation der Selenoproteinbiosynthesemaschinerie durch Hypoxie.....	59
3.1.11	Regulation der Promotoren von Selenoproteinen durch Hypoxie.....	60
3.1.12	Regulation von SePP durch die Glutamin Konzentration im Medium	62
3.2	Regulation von Selenoproteinen und der Selenoproteinbiosynthese in humanen mesenchymalen Stammzellen	63
3.2.1	Hypoxie Nachweis <i>in-vitro</i>	63
3.2.2	Regulation von Selenoproteinen durch Hypoxie in MSC	63
3.2.3	Regulation von SePP-Rezeptoren durch Hypoxie	64
3.2.4	Regulation von Selenoprotein-Biosyntheseenzymen durch Hypoxie.....	65
3.2.5	Regulation von intrazellulären selenbindenden Proteinen	66
3.3	Effekt von Polytrauma auf die Se-Spiegel im Menschen	67
3.4	Klinische Studie „Se und Schilddrüsenhormone bei Neugeborenen mit klinischer Sepsis“	68
4.	Diskussion	71
4.1	Hypoxie führt zu einer Umverteilung von Sec.....	71
4.2	Regulation der Sec Biosynthese ist HIF unabhängig	73
4.3	Alternative Regulation des Selenoproteoms	73
4.4	Evolution von Selenoproteinen und Sauerstoff.....	74
4.5	Dynamische Expression von Selenoproteinen	74
4.6	Bedeutung des Glutamin Status für die Selenoprotein Biosynthese	75
4.7	Hypoxie während der Differenzierung und Regeneration	75
4.8	Klinische Studie: Se bei Polytrauma-Patienten.....	76
4.9	Klinische Studie: Se bei Neugeborenen	77
4.10	Fazit und Ausblick	78
5.	Literaturverzeichnis:.....	79
6.	Danksagung	91
7.	Publikationsliste, Vorträge, Studienkoordination, Erfindungen und Auszeichnungen....	93
7.1	Publikationen während der Promotion.....	93
7.2	Abstracts auf internationalen Konferenzen	93
7.3	Vorträge auf nationalen und internationalen Konferenzen	95
7.4	Klinische Studie:	95
7.5	Erfindungen während der Promotion	95

7.6	Preise während der Promotion:	96
8.	Anhang	97
8.1	Rezepte	97
9.	Primer	98
9.1	Klonierungs Primer	98
9.2	RT-PCR Primer	99
11.	Eidesstattliche Erklärung.....	100

Widmung

Meinen Lieben

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
APACHE	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
BCA	Bicinchoninsäure
Br	Brom
Ca	Calcium
CA9	Carbonic Anhydrase IX
cDNA	Copy DNA
CP	Ceruloplasmid
CRP	C-Reaktives Protein
Ct	Cycle threshold
Cu	Kupfer
DIO	Dejodase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPS	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSec	Eukaryotic Elongation Factor, Selenocysteine-TRNA-Specific
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FABP1	Fatty Acid binding Protein 1
Fe	Eisen
FKS	Fetales Kälberserum
G418	Geneticin
GPX	Glutathion Peroxidase
GSH	Glutathion
GSR	Glutathion Reduktase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat
HIF	Hypoxie indizierbarer Faktor
HRE	HIF responsives Element
HRP	Horseradish Peroxidase

IL6	Interleukin 6
kDa	Kilo Dalton
KO	Knock-Out
LB Medium	Lysogeny Broth Medium
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	low density lipoprotein receptor-related protein
Luc	Luciferase
M	Molar
min	Minute
mL	Milliliter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stamm Zellen (Cells)
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NPC	Nutritional Prevention of Cancer
NPGPX	GPX7
O ₂	Sauerstoff
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PGK1	Phosphoglycerate Kinase 1
PHD	Prolyl Hydroxylase
PSTK	Phosphoseryl-tRNA Kinase
PTU	Propylthiouracil
Q	Glutamin
RLU	Relative Licht Einheiten (Units)
ROS	Reaktive Sauerstoff (Oxygen) Spezies
rpm	Revolutions per minute
rT3	reverse T3
RT-PCR	Real-Time PCR
SBP2	SECIS binding Protein 1
SCLY	Sec Lyase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Se	Selen
SEAP	Sekretierte Alkalische Phosphatase
sec	Sekunde
Sec	Selenocystein
SECIS	Sec – Insertions-Sequenz
SELECT	Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial
SelenBP1	Selen bindendes Protein 1
SELH	Selenoprotein H
SELI	Selenoprotein I

SELK	Selenprotein K
SELM	Selenoprotein M
SELN	Selenoprotein N
SELO	Selenoprotein O
SELS	Selenoprotein S
SELT	Selenoprotein T
SeMet	Selenomethionin
Sep 15	15 kDa Selenoprotein
SEPP	Selenoprotein P
SEPSECS	Sep (O-phosphoserine) tRNA:Sec (selenocysteine) tRNA synthase
SEPX1	Selenoprotein X1
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response- Syndrom
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SPS2 bzw SEPHS2	Selenophosphate Synthetase 2
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TGF- β	Transforming Growth Faktor β
Tm	Schmelz Temperatur
TR	Thioredoxinreduktase
TRIT1	tRNA Isopentenyltransferase 1
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
TR α und β	Schilddrüsenhormon (Thyroid hormone) Rezeptor α and β
TXRF	Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse
Ub	Ubiquitin
USA	United States of Amerika
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor, E3 Ubiquitin Protein Ligase
WT	Wild-Type
Zn	Zink

1. Einleitung

1.1 Das Element Selen in der Umwelt und im Menschen

Auf der Suche nach dem Ursprung von Selen muss man in der Geschichte bis in das Jahr 1817 zurückgehen, in dem der Chemiker und Mediziner Jöns Jakob Berzelius in Stockholm das Element entdeckte und auf den Namen Selen taufte (Arner 2010). Selen leitet sich von dem griechischen Wort Selene, was Mond bedeutet, ab. Auch in der griechischen Mythologie findet sich Selene, die Göttin des Mondes, wieder, welche ihrem Liebhaber Endymion ewigen Schlaf schenkte. Im Periodensystem der Elemente ist Selen mit dem Elementsymbol Se in der sechsten Hauptgruppe und vierten Periode eingeordnet, hat die Ordnungszahl 34 und gehört zur Gruppe der Chalkogene, welche ebenfalls Sauerstoff (O), Schwefel (S), Tellur (Te) Polonium (Po) und Livermorium (Lv) beinhaltet. Selen gehört zusammen mit Tellur zu der Gruppe der Halbmetalle.

„Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift; allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift sei.“ Dieses Zitat von Paracelsus trifft auch und besonders auf Se zu. In hohen Dosen führt Se zu einer Vergiftung (Selenose), charakterisiert durch Haarausfall, Verlust der Nägel und starkem Durchfall sowie Übelkeit. Spezifische Therapieoptionen gibt es keine. Erste Beschreibungen einer Selenose stammen vermutlich von Marco Polo. Dem gegenüber stehen Krankheiten, die durch Selenmangel begünstigt werden; hier sind die Keshan- und Kashin-Beck Krankheiten beim Menschen und die Weißmuskelkrankheit in der Viehzucht zu nennen.

Die Keshan Krankheit ist eine in China auftretende Kardiomyopathie, welche zuerst in der Region Keshan beschrieben wurde. Im Verlauf der Krankheit kommt es zu einer Kalzifizierung des Herzmuskels. Als Ursache wird die Infektion eines selenarmen Individuums mit dem Coxackie Virus diskutiert. Die durch die Regierung verordnete Se-Supplementation führte zu einer Eliminierung der Krankheit (Loscalzo 2014). Die Kashin-Beck Krankheit tritt noch heute in selenarmen Gebieten Chinas, Nepals und Tibets in Form von gelenkknorpeldegenerativem Minderwuchs auf. Die genaue Ursache ist nicht bekannt. Es werden Mykotoxine, Cocksackie Virusinfektionen und ein Mangel an Se und Jod verantwortlich gemacht. Eine Se-Supplementation hat bei ausgebrochener Krankheit keine Aufhebung der Symptome zur Folge, eventuell aber eine Kombination aus Se und Iod (Fairweather-Tait et al. 2011, Moreno-Reyes et al. 1998). Auch hier lässt sich durch eine bessere Selenzufuhr das Erkrankungsrisiko verringern.

Die Weißmuskelkrankheit ist eine in der Viehzucht beobachtete, der Keshan Krankheit ähnliche Erkrankung. Auch hier wird ein Selenmangel als Ursache beschrieben. Eine Kalzifizierung der Muskulatur ist namensgebend für die Krankheit, eine Se-Supplementation verhindert das Auftreten der Kalzifizierung (Loscalzo 2014, Muth et al. 1958). In einer Studie von Beck und Kollegen wurde deutlich, wie wichtig der Selenstatus für die Virulenz von Cocksackie Viren ist. In dem genutzten Mausmodell hatte die Infektion bei guter Selenversorgung keine Auswirkungen, war hingegen in selendefizienten Mäusen fatal (Beck et al. 1995). Schon 1950 fanden Schwarz und Foltz, dass Se eine Komponente des von ihnen benannten "Faktor 3" ist und Ratten vor einer durch Mangelerkrankung hervorgerufenen Lebernekrose schützt. Somit wurde Se als essentielles Spurenelement definiert (Schwarz and Foltz 1999). Schnell wurde klar, dass eine ausgewogene Selenversorgung elementar für die menschliche Gesundheit ist. Es ist nicht verwunderlich, dass das Selenvorkommen in den landwirtschaftlich genutzten Flächen mit der täglichen Selenaufnahme einhergeht und somit auch mit den Selenspiegeln im menschlichen Blut der Bevölkerung. So unterscheiden sich Länder oder Regionen in dem Bodenvorkommen von Se und daraus abgeleitet ergibt sich die landesspezifische tägliche Selenaufnahme (Rayman 2005) (Tabelle 1).

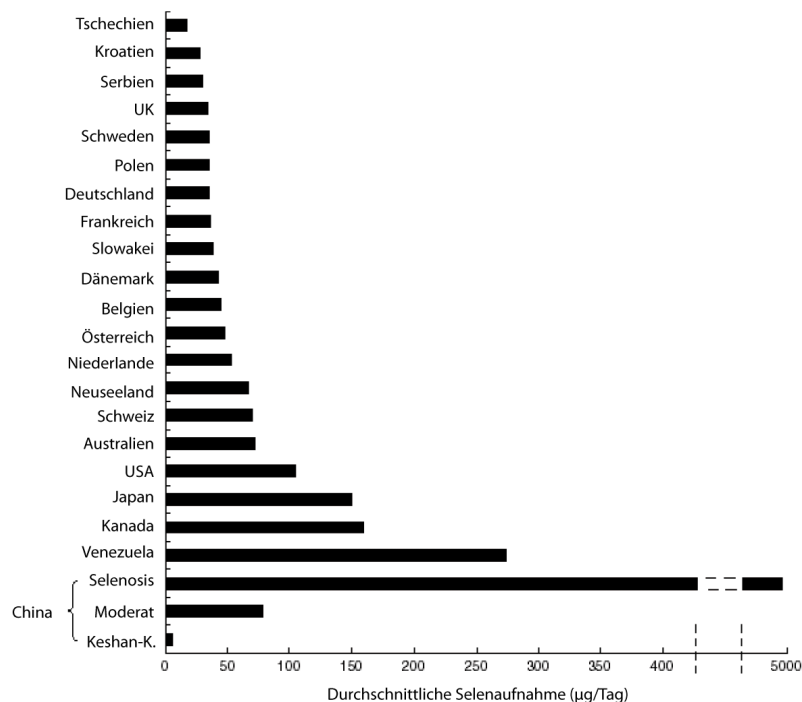


Abbildung 1. Selenversorgung in unterschiedlichen Ländern

Die Länder sind aufgereiht nach der täglichen Selenaufnahme. In China variiert die Aufnahme nach Region von Selenosis über moderat bis hin zur Unterversorgung und Keshan-Krankheit. (Abbildung modifiziert nach (Rayman 2005))

Die empfohlene minimale Selenaufnahme liegt zwischen 40-55 µg/Tag. Neuere Empfehlungen gehen von 1 µg Se pro kg Körpergewicht aus (Schomburg 2012).

Zusammenfassend muss man konstatieren, dass die europäische Bevölkerung eher selenunterversorgt ist, konträr zu Nord- und Süd-Amerika, die eine hohe tägliche Selenaufnahme zeigen. Auf einen Blick wird klar, dass kein anderes Land auf der Welt solch ein Gefälle in der Selenaufnahme aufzeigt wie China. So zieht sich ein endemischer Gürtel von Keshan und Kashin-Beck Krankheit durch dieses Land, der stark mit der Selenversorgung im Boden korreliert. Neuste Forschungsergebnisse erklären dieses Ungleichgewicht durch den Monsunregen, der atmosphärisches Se vor dem Lössplateau präzipitiert (Abbildung 2).

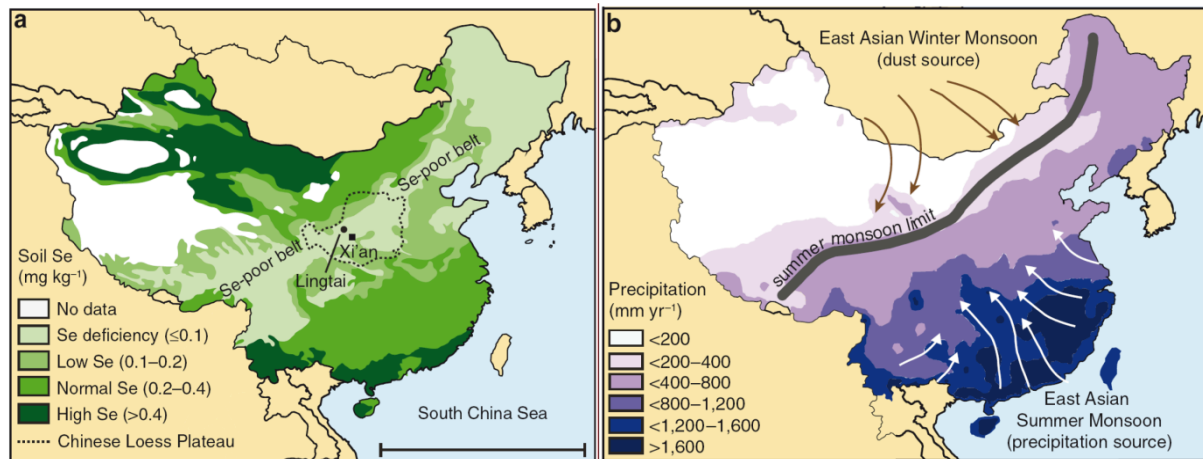


Abbildung 2. Endemische Gebiete für Keshan und Kashin-Beck Krankheit sind möglicherweise durch den Monsun hervorgerufen. (A) Selenversorgung in den Regionen Chinas zeigen einen Se-armen Gürtel in der Xi'an Region. (B) Präzipitation von marinen Se vor dem selenarmen Gürtel (Abbildung modifiziert nach (Blazina et al. 2014))

Eine Vorreiterrolle im eher selenarmen Europa nimmt Finnland mit ihrem in 1984 initiierten landesweiten Selensupplementationsprogramm ein. Hierfür wurde der landwirtschaftlich genutzte Dünger systematisch mit Natrium Selenat versetzt. So lag die tägliche Selenaufnahme 1984 noch bei 25 µg und konnte innerhalb von nur einem Jahr auf 40 µg gesteigert werden. Mittlerweile hat sich die Aufnahme bei 80 µg/Tag eingependelt. Damit würde sich Finnland in Abbildung 1 zwischen den gut versorgten Ländern Australien und USA einreihen. Bisher ist noch kein weiteres Land dem finnischen Beispiel gefolgt (Alfthan et al. 2014).

Pflanzen nehmen das Se aus dem Boden auf, und über die Verstoffwechselung zu Selenomethionin (SeMet), Sec, Selenmethylselenocystein, Selenocystathionine oder γ -Glutamyl-Se-methylcystein kommt Se in die Nahrungskette des Menschen. In der Natur kommen auch anorganische Selenformen wie Selenit (SeO_3^{2-}) und Selenat (SeO_4^{2-}) vor. In Proteine wird Se, im Gegensatz zu anderen Spurenelementen, welche von Proteinen oft im enzymatischen Zentrum posttranslational gebunden werden, durch die zwei Aminosäuren Sec und SeMet cotranslational eingebaut (Schomburg and Kohrle 2008) (Abbildung 3).

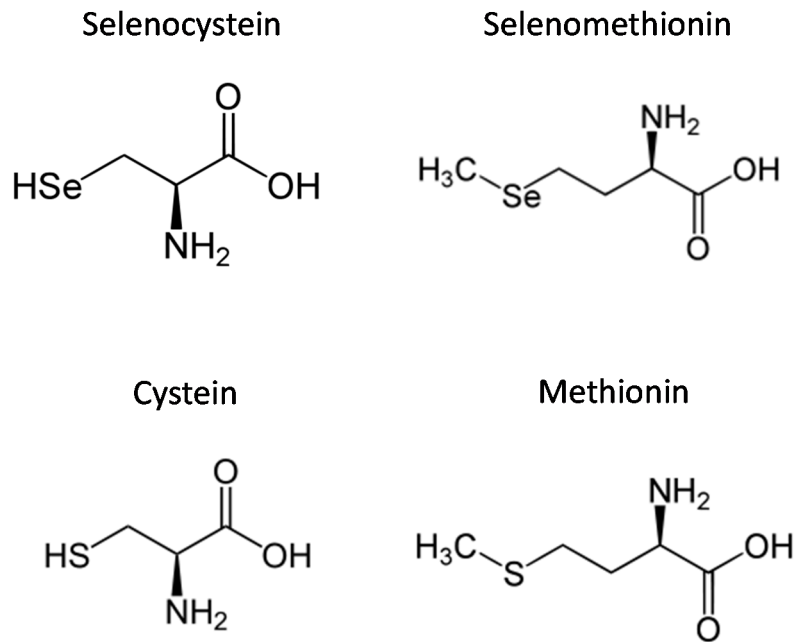


Abbildung 3. Vergleich von selen- und schwefelhaltigen Aminosäuren

Zwei Aminosäuren können als Se-haltige Formen in Proteine eingebaut werden. In beiden Fällen ist das Schwefelatom durch ein Selenatom ausgetauscht. Sec hat einen niedrigeren pKa Wert und ist damit unter physiologischem pH Bedingungen, im Gegensatz zu Cystein, ionisiert (Arner 2010).

Der Mensch nimmt anorganische und organische Selenformen über die Nahrung auf. Anorganische Selenformen sind Selenit oder Selenat, wobei Selenat zu Selenit assimiliert wird. Dieser Schritt ist gefolgt durch die nicht enzymatische Reaktion mit GSH. Das daraus gebildeten Intermediat GS-Se-SG wird zu Selenid (H_2Se) reduziert. Selenid ist hochreaktiv und stellt einen Knotenpunkt im Selenstoffwechsel dar. Von Selenid ausgehend erfolgt über die Aktivierung zu Selenophosphat die Biosynthese der Aminosäure Sec-tRNA[Ser]Sec (Selenocystein), welches in das aktive Zentrum von Selenoproteinen eingebaut wird. Außerdem können aus Selenid die exkretorischen, den Organismus verlassenden, Selenformen Dimethylselenid, das Trimethylselenonium-Ion oder Selenozucker gebildet werden. Die letzten beiden werden über den Urin ausgeschieden, wohingegen Dimethylselenid über die Atemluft exhaliiert wird. Als fester Bestandteil von Spermien verlieren Männer über die Ejakulation Se (Ursini et al. 1999). Bei Frauen erfolgt ein vergleichbarer Selenverlust im Rahmen der Menstruation. Durch den Abbau von Selenoproteinen wird Sec frei, dieses kann wieder über Selenid in den Kreislauf aufgenommen und über Sec-tRNA in Selenoproteine eingebaut werden (Kurokawa et al. 2011). Die organische Selenform SeMet kann direkt in den Kreislauf eingespeist werden; bei Sec erfolgt über die oben genannten Zwischenstufen unter beträchtlichem Energieverbrauch die Biosynthese von Sec-tRNA, ehe es wieder in Selenoproteine eingebaut werden kann. Das oft als Supplement verkaufte SeMet kann zum

Aufbau eines körpereigenen Selenspeichers genutzt werden. Es wird unspezifisch anstelle von Methionin in alle Proteine eingebaut. Durch die Transselenierung kann das Se aus SeMet über die Zwischenform von Selenid dem funktionellen Selenzyklus zugeführt werden (Birringer et al. 2002, Schomburg and Kohrle 2008) (Abbildung 5).

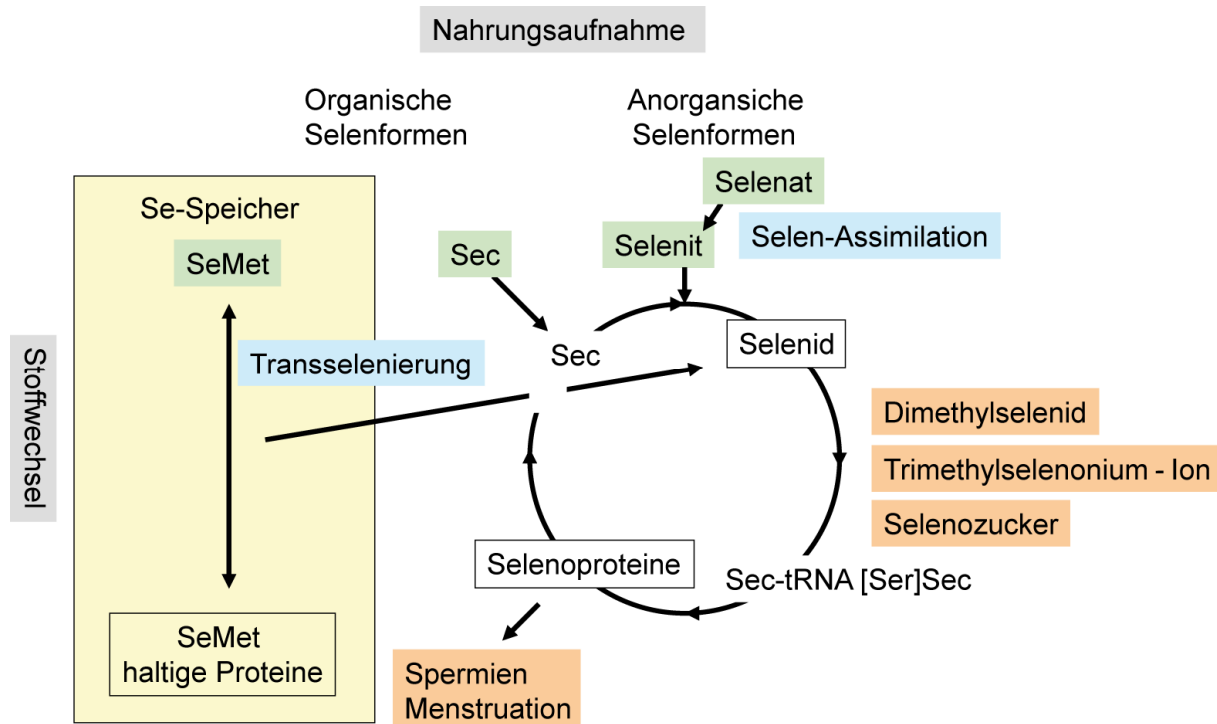


Abbildung 4: Kreislauf der Selenaufnahme, Verstoffwechselung und Exkretion im menschlichen Körper

Se muss über die Nahrung aufgenommen werden (grün hinterlegt). Über die Assimilierung oder Transselenierung wird das Se für den Kreislauf verfügbar gemacht (blau hinterlegt). Selenid ist ein Knotenpunkt; von hier aus können funktionell aktive Selenoproteine synthetisiert werden (weiß hinterlegt) oder über die orange hinterlegten Selenformen den Körper verlassen. SeMet haltige Proteine bilden den Selenspeicher (orange hinterlegt).

1.2 Die Biologie der Selenoproteine

Es gibt SeMet- oder Sec-enthaltende Selenoproteine. Die Biosynthese und der Einbau von Sec erfolgen über viele Intermediate und unterliegen einer stringenten Regulation. Sec ist aufgrund seiner chemischen Eigenschaften in Selenoenzymen oft in deren aktiven Zentren zu finden. Der Einbau von SeMet ist unspezifisch und unterliegt keiner Regulation. Unter Normalbedingungen hat nur, je nach Selenversorgung, 1 von 1000 Albuminen ein SeMet in seiner Proteinsequenz (Burk et al. 2001).

1.2.1 Sec-Biosynthese

Sec zeichnet sich durch eine Reihe biologischer Besonderheiten aus. Sec ist nicht nur die 21^{te} proteinogene Aminosäure, die nach der Entdeckung zu einer Erweiterung des Genetischen Codes von 20 auf 21 führte, sondern ist auch für die Rekodierung des UGA Stoppcodons verantwortlich. Desweiteren ist die Sec-tRNA auch mit 90 Nucleotiden die größte tRNA im Menschen. Zur Evolution von Sec und seiner Rekodierung des UGA Codons gibt es zwei Hypothesen. Im ersten Model ist Sec ein Bestandteil des Ur-Codes in anaeroben Bakterien. Doch der partielle atmosphärische Sauerstoffanstieg über die Zeit führte zu einem stetigen Anstieg des Selektionsdrucks, da Sec schnell oxidiert. Im anderen Model stieß Sec zu dem bereits existierenden genetischen Code hinzu und ist daher eine Erfindung der Evolution. Phylogenetische Vergleiche unterstützen die zweite Hypothese (Hatfield et al. 2006). Von dem Sec kodierenden Gen gibt es nur eine Kopie im menschlichen oder murinen Genom. Dieser Fakt war ein Glücksfall für alle Selenforscher, da mit Hilfe von transgenen Mäusen es möglich ist, die Sec-tRNA (das Trsp Gen) auszuschalten. Dies erlaubt das (gewebespezifische) Studium der Auswirkungen von komplett fehlender Selenoprotein Expression. Dieser technologische Fortschritt hat maßgeblich zum Verständnis über die Bedeutung von Selenoproteinen in verschiedenen Geweben beigetragen (Conrad and Schweizer 2010). Die Methylierung der Sec-tRNA beeinflusst den präferentiellen Einbau in essentielle und nicht-essentielle Selenoproteine (Hatfield and Gladyshev 2002). Sec ist die einzige Aminosäure, die auf ihrer tRNA synthetisiert wird. Jedoch ist der Weg von der tRNA zum fertigen Sec lang und verbraucht Energie. Trsp bzw. tRNA^{[Ser]Sec} wird durch das Enzym Seryl tRNA Synthetase unter der Verwendung von ATP und Mg²⁺ mit Serin beladen. Die nun gebildete Seryl-tRNA^{[Ser]Sec} wird abermals unter Verbrauch von ATP durch das Enzym PSTK (O-Phosphoseryl-tRNA^{[Ser]Sec} Kinase) phosphoryliert. Damit hat die O-Phosphoseryl-tRNA^{[Ser]Sec} einen höheren Energiestatus erreicht. Noch immer hat die Aminosäure kein Se, dieses muss ebenfalls von Selenid zu Monoselenophosphat durch die Selenophosphat Synthetase 2 (SPS2) phosphoryliert werden. Da SPS2 selber ein Selenoprotein ist, welches selenabhängig exprimiert wird, spricht man hier von einem autoregulatorischen Mechanismus. Das Enzym SecS (Selenocystein Synthase) oder SepSecS (SeptRNA:SectRNA Synthase) formt das Intermediat Dehydroalanyl-tRNA^{[Ser]Sec}, welches den aktivierten Selendonor Selenophosphat akzeptiert. Dies ist der letzte Schritt und führt zu Sec-tRNA^{[Ser]Sec} (Bellinger et al. 2009) (Abbildung 5).

1.2.1.1 Phosphoseryl tRNA[Ser]Sec Kinase

Die Phosphoseryl tRNA[Ser]Sec Kinase (PSTK) wurde mittels genetischen Vergleichs von Selenoproteine herstellenden und nicht-herstellenden Archaea gefunden. Nur zwei Kinasen waren in dieser Gruppe unterschiedlich, von denen eine Kinase auch zur eukaryotischen Kinase homolog war. Klonierung und Aktivitätsbestimmungen bestätigten die Aufgabe von PSTK in der Sec-Biosynthese (Carlson et al. 2004). Später bestätigten siRNA basierende Experimente PSTK als tatsächlichen Flaschenhals für die Synthese von Selenoproteinen (Renko et al. 2009).

1.2.1.2 SeptRNA:SectRNA Synthase

Wenige Jahre Später wurde SeptRNA:SectRNA Synthase (SepSecS) entdeckt (Xu et al. 2007b, Yuan et al. 2006). Bereits vor der funktionellen Charakterisierung war SepSecS als SLA/LP (soluble liver antigen/liver pancreas) bekannt und in der Literatur als Faktor beschrieben, der bei der Selenoproteinbiosynthese eine Rolle spielt (Gelpi et al. 1992). SLA Auto-Antikörper dienen noch heute als Marker für Autoimmunhepatitis. Reaktives Selenid oder aktiviertes Selenophosphat oder andere Metabolite könnten SepSecS durch Proteinmodifikationen immunogen machen, dies ist aber spekulativ (Palioura et al. 2010). Die enorme Bedeutung von SepSecS wurde bei der Beschreibung von inaktivierenden Mutationen im Menschen deutlich, da diese bei Funktionsverlust beider Allele zu schweren Atrophien im Gehirn führen (Agamy et al. 2010).

1.2.1.3 Selenophosphat Synthetase 2

Selenophosphat Synthetase 2 (SPS2) nimmt unter den Enzymen der Sec-Biosynthese eine besondere Rolle ein. Es beinhaltet selber ein Sec in seiner Struktur und stellt somit ein autoregulatorisches Element in der Sec-Biosynthese dar. So konnte schon im Jahr 2000 gezeigt werden, dass Fruchtfliegen ein funktionelles SECIS Element in ihrem SPS2 Gen tragen (Hirosawa-Takamori et al. 2000). Ebenfalls siRNA gestützte Versuche zeigten, dass SPS2, genauso wie PSTK, einen Flaschenhals in der Selenoproteinbiosynthese darstellt (Xu et al. 2007a). Entgegen anfänglicher Vermutungen hat SPS1 keine funktionelle Rolle in der Selenoproteinbiosynthese (Xu et al. 2007a).

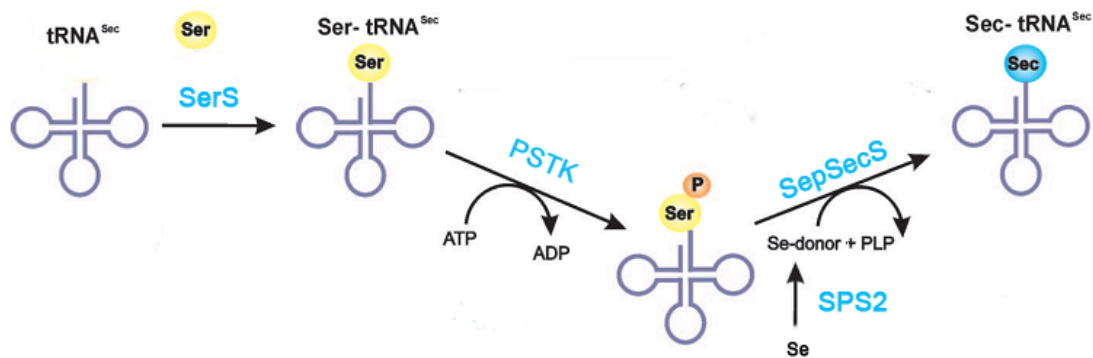


Abbildung 5. Biosynthese von Sec ist ein energiekonsumierender vielschichtiger Prozess

Die tRNA wird als erstes mit Serin zu Seryl-tRNA aminoacetyliert und danach zu Phosphoseryl-tRNA phosphoryliert. Im letzten Schritt wird aus dieser mit einem Se-Donor die Sec tRNA gebildet. SerS, Seryl-tRNA Synthase; PSTK, Phosphoseryl tRNA Kinase; SPS2, Selenophosphat Synthetase; SepSecS, (SeptRNA:SectRNA Synthase). Modifiziert nach (Yuan et al. 2006, Palioura et al. 2010).

Die nun fertige tRNA^{[Ser]Sec} unterliegt vor dem Einbau in Selenoproteine postsynthetischen Modifikationen. Am bekanntesten ist die Uracil-Methylierung an Position 34. Diese scheint verantwortlich für eine hierarchische Expression von Selenoproteine unter Selenmangel zu sein. Bei hoher zellulärer Selenversorgung kommt es zu einer Methylierung an Position U34 und alle Selenoproteine werden mit Sec versorgt. Bei niedriger Selenversorgung werden nur essentielle Selenoproteine wie die Glutathion Peroxidase 4 (GPX4) oder die Thioredoxin Reduktase 1 (TR1) exprimiert und die tRNA liegt unmethyliert vor (Hatfield and Gladyshev 2002). Weitere Evidenz lieferten Mausmodelle mit mutiertem Trsp (Turanov et al. 2011). Noch ist das Enzym, die Methyltransferase, nicht gefunden. Eine weitere Modifikation ist die Isopentenylierung an Adenosin 36 der tRNA, welches ein Erfordernis für die expressionsbeeinflussende Methylierung ist. Erst kürzlich wurde das isopentenylierende Enzym TRIT1 als erstes der modifizierenden Enzyme beschrieben (Fradejas et al. 2013).

1.2.2 Einbau von Sec in Selenoprotein mRNA

Verschiedene cis- und trans-agierende Faktoren sind für die Sec Inkorporation und UGA Rekodierung nötig, um in der Zelle eine fehlerfreie Translation von Selenoprotein mRNA zu fertigen Selenoproteinen zu gewährleisten. Zentral für den Sec Einbau sind ein im mRNA Leseraster befindliches UGA Stoppcodon und eine in der 3'UTR lokalisierte SECIS (Sec Insertions Sequenz) Haarnadelstruktur. Zwei verschiedene Typen von SECIS Elementen sind in Eukaryonten beschrieben, welche sich in ihrer apikalen Schleife unterscheiden (Hatfield et

al. 2006). Diese SECIS Haarnadelstrukturen werden von dem SECIS Binding Protein 2 (SBP2) erkannt und gebunden (Copeland et al. 2001, Copeland et al. 2000, Copeland and Driscoll 1999). SBP2 Mutationen im Menschen führen zu einer verminderten Expression von Selenoproteinen. Dadurch verändern sich die Schilddrüsenhormon Werte im Serum (Dumitrescu et al. 2005). Das SECIS-bindende Protein SBP2 rekrutiert den Elongationsfaktor EFSec (eukariotischer Sec-tRNA-spezifischer Elongationsfaktor), welcher die Rekodierung des UGA und den Einbau von Sec vermittelt. EFSec bindet Sec-tRNA^{[Ser]Sec} und bringt es zur ribosmalen A Stelle, so dass es in die wachsende Proteinkette eingebaut werden kann (Fagegaltier et al. 2000, Tujebajeva et al. 2000).

1.2.3 Aminoglykoside

Das Prinzip der UGA Stoppcodon Rekodierung ist klinisch relevant. Das zeigt sich durch den Wirkungsmechanismus der Antibiotikaklasse der Aminoglykoside. Diese werden trotz ihres Nebenwirkungsspektrums (vor allem Nephro- und Ototoxizität) als first-line Medikament bei der neonatalen Sepsis oder auch zur Prävention und Behandlung von Pneumonien eingesetzt (Leibovici et al. 2009). Aminoglykoside führen sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten zu einem Überlesen des Stoppcodons und einem Falscheinbau von Aminosäuren. Prokaryoten reagieren allerdings sensibler auf Aminoglykoside, was deren Einsatz als Antibiotikum ermöglicht (Davis 1987, Martin et al. 1989). Da Sec durch ein Stoppcodon rekodiert und oft im aktiven Zentrum lokalisiert ist, scheinen Selenoproteine besonders vulnerabel auf eine Aminoglykosidbehandlung anzusprechen (Tobe et al. 2013, Handy et al. 2006). Eine entsprechende klinische Studie zum Beweis der Relevanz dieser Ergebnisse für den Menschen fehlt noch.

1.3 Einteilung und Funktion von Selenoproteine

Nach Vollendung des „Human Genome“ Projektes war es möglich, mit Hilfe von bioinformatischen Algorithmen das Selenoproteom in seiner Gesamtheit in Maus und Mensch zu vergleichen. Hier wurden sich die oben beschriebenen genomischen Eigenschaften von Selenoprotein Genen zu Nutzen gemacht. So wurde nach UGA Stopp Codons gesucht, die zum einem im mRNA Leserraster lokalisiert waren und zum anderen von einem SECIS Element in 3'-Position gefolgt werden. Nach dieser Analyse hat der Mensch 25 Selenoproteine und die Maus nur 24, da GPX6 im Menschen ein Selenoprotein darstellt, welches in der Maus als Cystein-Ortholog existiert (Kryukov et al. 2003).

Grob lässt sich die Familie der Selenoproteine in 4 übergeordnete Gruppen einteilen: die drei Enzymfamilien der Dejodasen, Glutathion Peroxidasen und Thioredoxin Reduktasen, und die verbleibenden Selenoproteine mit noch unbekannter oder nur teilweise erforschter Funktion (Kryukov et al. 2003).

1.3.1 Dejodasen

Schilddrüsenhormone werden in der Schilddrüse gebildet. Ganz klassisch werden die Prohormone im Körper durch Dejodasen (DIO) aktiviert bzw. inaktiviert. Die DIOs sind Selenoproteine (Behne et al. 1990). Die Schilddrüse produziert hauptsächlich Thyroxin (T4), welches peripher in das aktive Triiodthyronin (T3) umgewandelt wird (Dentice and Salvatore 2011). Serum T4 Spiegel sind etwa um einen Faktor 50 höher als T3 Spiegel. Schilddrüsenhormone werden aktiv über die Zellmembran transportiert. Intrazellulär wandert das aktivierte T3 in den Zellkern, wo es an den TR α oder TR β Rezeptor bindet und die Genexpression aktiviert (Forrest and Vennstrom 2000). Die DIO 1 und 2 sind für die 5' Dejodierung, und somit Aktivierung von T4 zu T3 verantwortlich. Verglichen zur DIO 3, welche T3 oder T4 zu T2 oder reverses rT3 inaktiviert (Schomburg 2012, Wirth et al. 2014). Die systemischen Schilddrüsenhormonspiegel werden hauptsächlich durch die DIO 1 reguliert, wohingegen die Feinabstimmung auf zellulärer Ebene durch die DIO 2 und 3 vermittelt wird (Gereben et al. 2008). In Mäusen zeigt die Dio 1 einen Geschlechterunterschied in der Expression und Aktivität (Riese et al. 2006). Auch organspezifisch verändert sich dieser; in den Nieren bleibt der Unterschied über das Leben bestehen, wohingegen organspezifische Unterschiede in der Leber mit zunehmendem Alter verschwinden (Schomburg et al. 2007). Ein bis heute nicht verstandenes, häufig im Krankenhaus beobachtetes Phänomen tritt bei kritisch Erkrankungen wie der schweren Sepsis auf. Das sogenannte „low T3 Syndrom“ oder auch „Nonthyroidal illness syndrom“ ist durch stark absinkende Schilddrüsenhormonlevel charakterisiert. Hypothesen zufolge könnte dies akut zur Unterstützung des Immunsystems dienen, führt aber chronisch, aufgrund der physiologischen Bedeutung von Schilddrüsenhormonen, zu thermischen und metabolischen lebensbedrohlichen Problemen für die Patienten (Boelen et al. 2011).

1.3.2 Glutathion Peroxidasen

Die größte Gruppe in der Familie der Selenoproteine nehmen die Glutathion Peroxidasen (GPX) ein. Im Menschen gibt es acht, wovon GPX 1,2,3,4 und 6 Selenoproteine darstellen (Kryukov et al. 2003). Ihre Funktion ist es, die Integrität der Zelle zu schützen und reaktive

Sauerstoffspezies (ROS) zu neutralisieren (Brigelius-Flohe 1999). GPX1, welche im Zytosol exprimiert wird, neutralisiert als Homotetramer Hydrogen Peroxid (H_2O_2) unter dem Verbrauch von Glutathion (GSH) zu Wasser. Die Expression von GPX1 ist stark abhängig von der Selenverfügbarkeit (Bermano et al. 1995). Unter Selenmangel sinkt auch die GPX1 Expression und somit die anti-oxidative Kapazität, bei hoher Selenverfügbarkeit steigt die GPX1 Expression an. H_2O_2 wird hauptsächlich durch die mitochondriale Atmungskette oder durch an der Zelloberfläche befindliche Proteine gebildet und ist an einer Vielzahl von Signalkaskaden beteiligt (Brigelius-Flohe and Maiorino 2013). In hohen Dosen können ROS den zellulären Proteinen, Lipiden und Organellen Schaden zufügen, sind aber gleichzeitig als Botenstoffe wichtig (Hancock et al. 2001). Die Selenversorgung hält ROS regulierend im Gleichgewicht und hat damit durch die intrazelluläre Redox-Homöostase direkt Einfluss auf verschiedene Signalkaskaden (Brigelius-Flohe 2006).

GPX2 ist hauptsächlich in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes exprimiert. Hier wird eine gestörte Expression in Zusammenhang mit der kolorektalen Tumorigenese gestellt (Brigelius-Flohe and Kipp 2009). GPX3 ist die einzige Plasma-Glutathion Peroxidase und wird hauptsächlich von der Niere sekretiert (Kryukov et al. 2003). Aufgrund der antioxidativen Funktion ist eine schützende Wirkung gegen Arteriosklerose in der Literatur diskutiert (Buijsse et al. 2012).

Die Funktion von GPX6 ist noch nicht gut verstanden, das Enzym wird aber im olfaktorischen Epithel und während der Embryogenese exprimiert (Turanov et al. 2011).

Eine Sonderstellung unter den Glutathion Peroxidasen nimmt GPX4 ein. So neutralisiert es als einziges Enzym Lipidperoxide und dies im Gegensatz zu den anderen GPX als Monomer (Flohe et al. 2011). GPX4 kommt in der Zelle in drei Isoformen vor, welche spezifische Lokalisationen aufweisen. So findet man GPX4 an der Plasmamembran, in den Mitochondrien und im Zellkern (Ursini et al. 1995). Als Bestandteil von Spermien ist GPX4 das einzig bisher bekannte strukturgebende Selenoprotein (Ursini et al. 1999).

1.3.3 Thioredoxin Reduktasen

Thioredoxin Reduktasen (TR) gehören ebenfalls zu der Familie der Selenoproteine und sind Bestandteil eines wichtigen antioxidativen Netzwerkes (Lu and Holmgren 2014). Thioredoxine katalysieren Redox-Reaktionen und dienen hauptsächlich der Reduktion von Disulfid-Brückenbindungen (Lu and Holmgren 2014). Als Antioxidantien sind Thioredoxine in die für die Zellteilung wichtige Ribonukleotid Synthese involviert (Sengupta and Holmgren 2014). Die TR reduzieren oxidiertes Thioredoxin unter dem Verbrauch von NADPH und unterstützen so

das intrazelluläre ROS Abwehrsystem (Arner and Holmgren 2000). Es gibt drei Isoformen mit unterschiedlicher Gewebeexpression und Zelllokalisierung (Lu and Holmgren 2014). TR1 ist hauptsächlich in Zytosol und im Zellkern lokalisiert. TR3 ist in den Mitochondrien angesiedelt. Die Funktion von der hodenspezifischen TR2 ist noch nicht bekannt. TR1 und TR3 sind für die Mausentwicklung essentiell, da der Verlust von einem der beiden, ebenso wie von GPX4, im knock-out Embryo letal ist (Bondareva et al. 2007, Conrad et al. 2004, Imai et al. 2003). TR1 ist auch als ein denitrosylierendes Enzym beschrieben und stellt eine Verbindung von Selenstoffwechsel zu Stickstoffmonoxid Signalen und Modifikationen dar (Benhar et al. 2008).

1.3.4 Selenoprotein P

Von allen 25 Selenoproteinen hat nur ein Protein mehr als ein Sec und dieses ist Selenoprotein P. Dieses hauptsächlich von der Leber sezernierte Protein, welches bis zu 10 Sec einbauen kann, fungiert als Selentransporter für die peripheren Organe (Burk and Hill 2009). Als einziges Selenoprotein hat Selenoprotein P zwei SECIS Elemente in der 3' UTR (Saito and Takahashi 2002, Shetty et al. 2014). Selenoprotein P ist glykosiliert, daher kommen auch 2 Isoformen im Serum vor (Shetty et al. 2014). Die Bedeutung einer guten Selenversorgung durch Selenoprotein P wurde in der knock-out Maus deutlich. Verlust von Selenoprotein P führt zu schweren neurologischen Veränderungen, Minderwuchs und Infertilität (Schomburg et al. 2003). Obwohl die knock-out Maus einen so starken Phenotyp aufweist, ist bis jetzt noch kein Mensch mit einer Selenoprotein P Mutation identifiziert worden. Auf transkriptioneller Ebene wird Selenoprotein P durch Zytokine und TGF β Signalkaskaden reguliert (Hesse-Bahr et al. 2000, Mostert et al. 2001b). Ein weiteres Indiz dafür, dass Selenoprotein P auch *in-vivo* durch inflammatorische Signale reguliert wird, erbringen Studien eines Akut-Phase Mausmodells, in der ein starker Abfall von Selenoprotein P nach Lipopolysaccharide (LPS) Injektion beschrieben wird (Renko et al. 2009). Ebenso ist ein Abfall von Selenoprotein P in Sepsis Patienten gezeigt (Hollenbach et al. 2008). Diese Effekte unterscheiden sich im Modell eigenartigerweise bei männlichen und weiblichen Versuchstieren (Stoedter et al. 2010).

1.3.5 Selenoprotein S

Selenoprotein S ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und an der Qualitätskontrolle von neu translatierten Proteinen beteiligt. So interagiert Selenoprotein S mit Derlin und der E3-Ligase VCP, welche für die Retrotranslokation und proteasomale Degradation von falschgefalteten Proteinen verantwortlich sind (Ye et al. 2004). Selenoprotein S selber scheint als eine Reduktase zu fungieren, die mittels Thioredoxin Disulfid-Brückenbindungen aufspaltet

(Christensen et al. 2012). Die Expression von Selenoprotein S hängt maßgeblich von der Selenversorgung ab (Stoedter et al. 2010). Die Transkription von Selenoprotein S wird durch pro-inflammatorische Zytokine und den NFκB Signalweg, sowie durch die ER-Stress Antwort reguliert (Gao et al. 2006, Kim et al. 2007). „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) im Promoter von Selenoprotein S zeigen eine signifikante Assoziation mit den Spiegeln zirkulierender pro-inflammatorischer Zytokine (Curran et al. 2005).

1.3.6 Selenoprotein N

Selenoprotein N ist das einzige Selenoprotein im Menschen, in dem die durch eine Mutation hervorgerufene Krankheit klinisch charakterisiert ist. Mutationen im Selenoprotein N Gen führen zu Myopathie (Maiti et al. 2009). Dem im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Protein wird eine Rolle in der Ca⁺ Homöostase zugeordnet (Arbogast and Ferreira 2010).

1.3.7 Andere Selenoproteine und Sec-Recycling

Alle anderen Selenoproteine sind nur ansatzweise erforscht und warten auf eine vollständige funktionelle Charakterisierung. Auch der Abbau von Selenoproteinen ist bei weitem noch nicht so gut untersucht wie ihre Biosynthese. Das Enzym Selenocystein Lyase ist für das Recycling von Sec aus Selenoproteinen verantwortlich (Mihara et al. 2000). Die Selenocystein Lyase knock-out Maus zeigt interessanterweise einen metabolischen Phänotyp mit einer gestörten Glukose-Homöostase und Insulinsignalkaskade (Seale et al. 2012).

1.3.8 Selenbindende Proteine

Wie schon in Abbildung 4 beschrieben, nimmt Selenid eine zentrale Rolle in dem Selenstoffwechsel ein. Wie es molekular in der Zelle gebunden ist, wurde bisher nur indirekt untersucht. So wurden die Proteine SelenBP1 und FABP1 in Tierversuchen nach Injektion mit radioaktiv-markiertem Se⁷⁵ entdeckt (Banerjee and Sani 1982, Bansal et al. 1989). Ob diese Proteine Selenid oder Sec binden ist unbekannt. Das Protein SelenBP1 ist in einer Reihe von Erkrankungen wie Darmkrebs, Bronchialkarzinom und Brustkrebs differentiell reguliert (Wang et al. 2014, Zeng et al. 2013, Zhang et al. 2013). FABP1 gehört zu der Gruppe der fettsäurebindenden Proteine und wird hauptsächlich in Leber und Niere exprimiert (Atshaves et al. 2010). Darüber hinaus ist FABP1 ein vielversprechender Marker für akutes Nierenversagen (Devarajan 2011). Widersprüchlich hingegen wurden in einem siRNA

Bibliothekversuch Selenoproteine selber und Enzyme der Biosynthesemaschinerie als bestimmend für die intrazelluläre Selenkonzentration identifiziert (Malinouski et al. 2014).

1.4 Se und die Gesundheit des Menschen

Organe werden unter Selenmangel unterschiedlich gut mit Se versorgt, was zu dem Konzept der hierarchischen Se-Organversorgung führt (Schomburg and Schweizer 2009). Aufschluss gaben Studien zur SePP knock-out Maus; hier ist der periphere Transporter Selenoprotein P ausgeschaltet. In diesen Mäusen erwiesen sich Schilddrüse, Knochen, Testes und Gehirn als bevorzugte Organe der Selenversorgung (Schomburg et al. 2006, Renko et al. 2008, Pietschmann et al. 2014, Schweizer et al. 2005). Die hierarchische Versorgung während eines Selenmangels wird über eine organspezifische differentielle Expression von Rezeptoren (LRP2 und LRP8) vermittelt. Diese Rezeptoren binden Selenoprotein P und führen zur Aufnahme in die Zellen (Kurokawa et al. 2014). LRP2 und LRP8 sind bekannt aus dem Lipidstoffwechsel. Sie binden eine Vielzahl von Serumproteinen und nehmen sie über die Endozytose in die Zelle auf (Herz and Bock 2002). So werden zum Beispiel LRP8 in Knochen sowie Niere und LRP2 in Testes und Gehirn exprimiert (Pietschmann et al. 2014, Chiu-Ugalde et al. 2010, Burk et al. 2007, Olson et al. 2007).

Die Auswirkungen einer gestörten Expression von Selenoproteinen auf den menschlichen Organismus zeigte sich anhand der detaillierten Charakterisierung eines Patienten mit Mutationen im SBP2 Gen (Dumitrescu et al. 2005). Dieses wird für die Translation aller Selenoproteine benötigt. So zeigt der Patient eine verminderte Expression aller untersuchten Selenoproteine, mit Auswirkungen auf die Spermienreifung, Muskelphysiologie, Photosensitivität der Haut, Redox-Abwehr und Immunantwort. Interessanterweise zeigten die Patienten eine erhöhte Insulinsensitivität, welches das Phänomen von Diabetesinzidenz, Se-Supplementation und Selenoproteinen weiter unterfüttert (Schoenmakers et al. 2010). Der Schlüssel zum Verständnis dieser Zusammenhänge liegt möglicherweise in dem kürzlich publizierten Sbp2 knock-out Mausmodell (Seeher et al. 2014b, Seeher et al. 2014a).

Aufgrund der antioxidativen Wirkung von Se wurde der „National Prevention of Cancer Trial“ ins Leben gerufen (Clark et al. 1996). Die Se-Supplementations-Studie sollte den Einfluss von Se auf die Inzidenz von Hauttumoren untersuchen (Duffield-Lillico et al. 2003). Überraschenderweise konnte durch die Selensupplementation nicht das Sterberisiko durch Hautkrebs verringert werden, sondern das Risiko durch andere Krebserkrankungen wie Lungenkrebs, Prostatakrebs oder Darmkrebs zu sterben, sank in der supplementierten Gruppe

(Clark et al. 1996). Diese Daten hatten die Initiation der bisher größten Se-Supplementations-Studie SELECT (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) zur Folge. Das Primärziel, durch Erhöhung der antioxidativen Kapazität das Auftreten von Prostatakrebs zu verhindern, konnte weder durch Se oder Vitamin E alleine noch durch die Kombination erreicht werden (Lippman et al. 2009). Darüber hinaus stieg sogar das Risiko, an Prostatakrebs zu erkranken, in der Vitamin E supplementierten Studiengruppe signifikant an (Klein et al. 2011). Auch das Risiko von Typ 2 Diabetes stieg tendenziell, aber nicht signifikant, in der Se supplementierten Gruppe (Dunn et al. 2010). Im gleichen Jahr wurden die Ergebnisse des National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III) veröffentlicht. In diesem Bericht zeigte sich eine positive Korrelation der Serum Selenspiegel zu Risikofaktoren von Arteriosklerose (Laclaustra et al. 2010). Zu einem anderen Ergebnis kam die kürzlich veröffentlichte Studie „European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition Cohort“ (EPIC), in der gezeigt werden konnte, dass ein erhöhter Selenoprotein P Spiegel im Serum invers mit dem Risiko an Darmkrebs zu erkranken korreliert. Dieser Effekt ist bei Frauen besonders ausgeprägt (Hughes et al. 2014). Das Europa im Gegensatz zu den USA eher ein Selenmangelgebiet darstellt könnte die differenten Ergebnisse der vorhergenannten Studien erklären. Es bleibt zu beachten, dass bei der Interpretation von Supplementationsstudien immer die Selenspiegel der Probanden vor, während und nach der Studie beachtet werden müssen. So fällt zum Beispiel die Einordnung der durchweg positiven Effekte einer Se-Supplementation bei milder Graves' Orbitopathie schwer, da keine Selenspiegel vor oder nach der Supplementation bestimmt worden sind (Mancoske et al. 2011).

Ebenso intensiv und kontrovers diskutiert wird die Se-Supplementation bei kritischen Erkrankungen wie Sepsis (Schomburg 2007, Angstwurm et al. 2007). Während einer Sepsis kommt es zu einem Absinken der Selenoprotein P Spiegel (Hollenbach et al. 2008). Diese und andere Beobachtungen führten zu einer Reihe von Supplementations-Studien bei Sepsis Patienten mit unterschiedlichen Resultaten. Die Auswertung verschiedener klinischer Supplementations-Studien in Form von Meta-Analysen bescheinigt Se eine überlebensfördernde Wirkung (Alhazzani et al. 2013, Huang et al. 2013). So konnte schon 1998 beim „systemic inflammatory response syndrom“ (SIRS) im Verlauf ein deutlicher Unterschied zwischen überlebenden und versterbenden Intensivpatienten beobachtet werden (Forceville et al. 1998).

1.5 Sauerstoffregulation in der Zelle und im menschlichen Körper

Im Laufe der Evolution haben sich feinjustierte Sensor- bzw. Adaptationsmechanismen etabliert (Stamati et al. 2011). So reagiert der Körper auf Sauerstoffarmut mit der Produktion von Erythropoetin (EPO) in der Niere, die Organe oder Zellen produzieren „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) und die Zellen stellen ihren Metabolismus auf anaerobe Energiegewinnung um (Aragones et al. 2009, Tanaka and Nangaku 2013, Haase 2013). EPO führt zu Erythropoese, der vermehrten Produktion von roten Blutkörperchen, die den Sauerstoff aus der Lunge zu den Organen transportieren (Bunn 2013). VEGF führt zur lokalen Angiogenese, dem Wachstum von neuen Blutgefäßen, um eine ausreichende Gewebeversorgung zu gewährleisten (Semenza 1994, Shweiki et al. 1992). Bei suffizienten Sauerstoffkonzentrationen wird Glukose durch effiziente oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien in Energie umgewandelt. Bei Hypoxie hingegen wird Glukose durch anaerobe Glykolyse zur Energiegewinnung heran gezogen und der Zelle zur Verfügung gestellt. Dieser Prozess ist bei weitem nicht so effizient wie die oxidative Phosphorylierung. Das sauerstoffabhängige Umschalten wird auch „Pasteur Effekt“ genannt und wird auf molekularer Ebene hauptsächlich durch HIF1 (Hypoxic Inducible Factor 1) reguliert (Semenza 2007). Mit der Entdeckung von HIF1 α , dem durch Hypoxie aktivierten Transkriptionsfaktor, begann das Forschungsfeld der molekularen Mechanismen der sauerstoffabhängigen Genregulation (Semenza and Wang 1992). HIF1 besteht aus zwei Proteinen, einer konstitutiv exprimierten β Untereinheit, sowie einer sauerstoffregulierten α Untereinheit. Bei ausreichend Sauerstoff wird die α Untereinheit proteosomal abgebaut und bei Hypoxie stabilisiert (Weidemann and Johnson 2008). Durch die Prolyl Hydroxylasen (PHD) werden die Proline an Aminosäurepositionen 402 und 563 in einer Sauerstoff-, Eisen (Fe^{2+})- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Reaktion hydroxyliert (Schofield and Ratcliffe 2004). Diese Markierung führt zur Erkennung durch den Von-Hippel Lindau Faktor (VHL), welcher eine E3 Ligase rekrutiert. Diese fügt HIF1 α Ubiquitinreste an, welche nun als Markierung für den Abbau durch das 26S Proteasom dienen (Semenza 2007). Stabiles HIF1 α heterodimerisiert mit HIF1 β und wandert in den Zellkern, wo dieser Komplex an das HRE (HIF Response Element) bindet und die Expression von über 100 Genen reguliert (Benita et al. 2009) (siehe Abbildung 6).

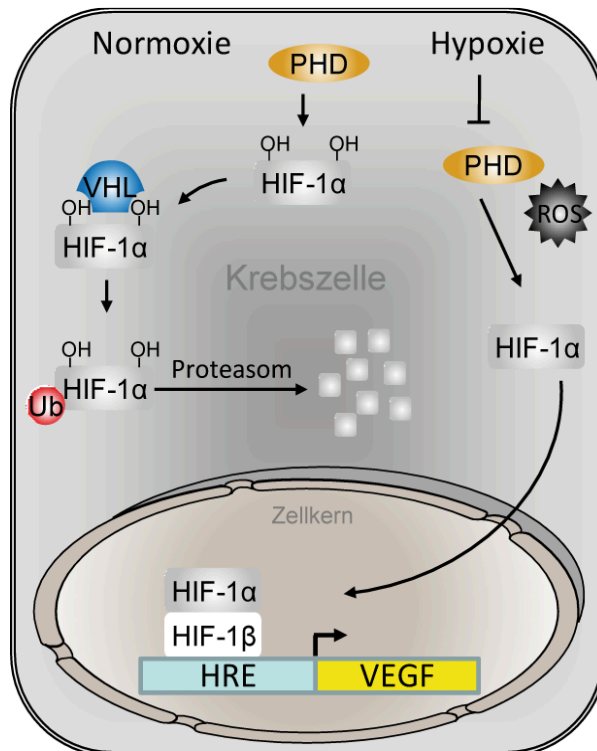


Abbildung 6. Sauerstoffabhängige HIF1α vermittelte Genregulation von VEGF exemplarisch in einer Tumor Zelle dargestellt.

Hier wird HIF1α in einer sauerstoffabhängigen enzymatischen Reaktion durch Prolyl-Hydroxylasen (PHD) bei hohen Sauerstoffkonzentrationen hydroxyliert. Diese Modifikation dient als Erkennungsmerkmal für den Von-Hippel-Lindau Faktor (VHL), was zu einer Polyubiquitinierung (Ub) und anschließender proteosomaler Degradation führt. Unter Hypoxie kann HIF1α nicht hydroxyliert und zusätzlich durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) stabilisiert werden. HIF1α heterodimerisiert mit HIF1β und bindet an HIF-responsive Elemente (HRE) in der genomischen DNA und vermittelt die Genregulationsantwort. (Strukturen sind aus der Servier Power Point Bank übernommen)

Das Gleiche gilt für den Transkriptionsfaktor HIF2α, da auch dieser bei ausreichend Sauerstoff abgebaut und bei Hypoxie stabilisiert wird (Loboda et al. 2010). Ebenfalls durch die Interaktion mit HIF1β wandert dieser in den Zellkern und reguliert teilweise HIF1α Zielgene aber auch HIF2α spezifische Gene (Keith et al. 2012). Dieses Wechselspiel erlaubt eine Feinjustierung der molekularen Hypoxieantwort. Die Rolle von HIF3α ist noch nicht geklärt (Semenza 2007). HIF Transkriptionsfaktoren wirken auf zellulärer Ebene, haben aber durch die Expression von EPO und VEGF auch Einfluss auf den gesamten Organismus. Für HIF2α wurde neben der Funktion als Transkriptionsfaktor auch eine Rolle als Translationsfaktor beschrieben (Uniacke et al. 2012).

Hypoxie spielt eine tragende Rolle in einer Vielzahl von Organen und Krankheiten wie Nierenschäden (Tanaka and Nangaku 2013), im adipösen Fettgewebe (Krishnan et al. 2012), während der Embryonalentwicklung und in Stammzellnischen (Simon and Keith 2008). Das

Überleben bei Hypoxie ist ein Markenzeichen von Krebszellen (Hanahan and Weinberg 2011). Aber auch bei Trauma, Schlafapnoe oder Schlaganfall (Tian et al. 2010, Mortelliti and Manning 2002, Nour et al. 2013) spielt die Sauerstoffversorgung eine zentrale Rolle. Beim experimentellen Schlaganfall in einem Mausmodell korreliert die Expression der selenresponsiven intrazellulären GPX1 mit dem Ausmaß der nekrotischen Areale (Wong et al. 2008).

In der Literatur finden sich Beispiele für eine Regulation der Antioxidativen-Kapazität durch Hypoxie. So sind die GPX3 genauso wie die Superoxid-Dismutase direkte HIF Zielgene (Bierl et al. 2004, Scortegagna et al. 2003). Während der Hypoxie wird die Thioredoxin Reduktase allerdings anders, und zwar durch HIF1-unabhängige Mechanismen herunterreguliert (Naranjo-Suarez et al. 2012).

Ein Beispiel für Zellen, die im menschlichen Körper angepasst an Hypoxie leben, sind Mesenchymale Stammzellen (MSC). MSC sind in der Lage, sich in unterschiedliche Gewebe wie Fett, Knorpel, Knochen oder Muskel zu differenzieren (Bianco et al. 2013). So kann eine einzige transplantierte Zelle eine funktionelle haematopoetische Umgebung bilden (Sacchetti et al. 2007). Diese Stammzellen leben relativ isoliert in hypoxischen Nischen (Haque et al. 2013).

Schlussfolgerung und Arbeitshypothesen

Eine Vielzahl von schweren Erkrankungen hat neben einem potentiell prädisponierend wirkenden Se-Mangel auch eine Minderversorgung mit Sauerstoff gemein. Es ist nicht bekannt, ob dieser Se-Mangel primär prädisponierend oder sekundär eine Folge der Erkrankungen ist. Der direkte Effekt von Sauerstoff auf Selenoproteine und ihre Biosynthese ist bisher noch unzureichend untersucht. Diese Arbeit soll die Hypothese überprüfen, dass (i) Sauerstoff einen direkten Einfluss auf die Expression von Selenoproteinen und ihrer Biosynthese hat; (ii) dieser Einfluss Zelltyp-spezifisch ist sowie (iii) klinisch relevant.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Plastikware und Enzyme

Alle Chemikalien waren, wenn nicht anders gekennzeichnet, von Sigma Aldrich oder Biomol GmbH, Hamburg, Germany, Bio-Rad Thermo-Fischer, oder Pierce gekauft. Die Plastikwaren wurden von Eppendorf, Greiner oder TPP bezogen. New England Biolabs lieferte die Restriktionsenzyme. Substanzen für die Zellkultur wurden vor dem Gebrauch durch Filtration (0,2 µm Porengröße) sterilisiert.

2.1.2 Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

Die Bakterien-Transformationen wurden in dem Escherichia Coli-K12-Sicherheitslaborstamm DH5α durchgeführt. Hepatokarzinome HepG2 Zellen wurden in DMEM:F12 Medium mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Erhältlich sind die Zellen beim DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) in Braunschweig unter der Artikelnummer ACC 180. Primäre MSC Zellen wurden in Kooperation mit Sven Geißler (Berlin Center for Regenerative Therapies und Julius Wolff Institut) bearbeitet. Die Zellkulturexperimente wurden dort unter fachkundiger Anleitung durchgeführt.

2.1.3 Plasmide

Für die stabile oder transiente Expression von Proteinen oder Promotorgenanalysen wurde eine Vielzahl von Plasmiden verwendet (Tabelle 2).

Tabelle 2. Expressions-, Reporter- und Kontrollplasmide

Expressionsplasmide	Reporterplasmide	Kontrollplasmide
pCDH HIF1α	HRE-Luciferase (Rohwer et al. 2008)	pCDH (System Bioscience, Kalifornien, USA)
pCDH HIF1α active	STAT-3 Luciferase (Dr. Peter Hofmann, Charité – Universitätsmedizin Berlin)	pCMV(Prof. Dr. Michael Schwarz, Universität Tübingen)
pCDH HIF2α	pBPLuga Cys (Kollmus et al. 1996)	pSEAP2 Basic Vektor (Clontech, Kalifornien, USA)
pCDH HIF2α active	pBPLuga Sec (Kollmus et al. 1996)	pGL4.74 [RLuc/TK] (Promega, Mannheim)
pCMV-ΔARNT (Prof. Dr. Michael Schwarz, Universität Tübingen)	pBPLuga Sec GPX4 SECIS	pGL4.10 [Luc2] (Promega, Mannheim)
	pBPLuga SePP 1+2 SECIS	

Selenoprotein
 Promoterkonstrukte von
 SPHS2, PSTK, SelenBP1,
 TR1, DIO1, DIO2,
 SEPSECS, GPX2, SELK,
 SEPP sind alle im pGL4.10
 Backbone

2.1.4 Synthetisierte Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei Life Technologies (Carlsbad, USA) bestellt. Lyophilisierte Oligonukleotide wurden im ersten Arbeitsschritt in destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 100 nM eingestellt, um im zweiten Schritt Arbeitsverdünnungen von 10 nM anzulegen. Eine Tabelle der in dieser Arbeit verwendeten Primersequenzen findet sich im Anhang (Tabelle S1).

2.1.5 Gebrauchswaren /Geräte

Tabelle 3. Reaktionssysteme

Name	Hersteller
Absolute TM QPCR SYBR (R) Green	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Dual Luciferase Reporterassay System	Promega (Madison, USA)
ECL Western Blot Detection Reagents	GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK)
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad (Hercules, USA)
Plasmid Midi Kit	Promega (Madison, USA)
Plasmid Mini Kit	Eppendorf (Hamburg)
QIAquick Gel Extraction	Qiagen (Hilden)
RNA Extraction kit	Qiagen (Venlo, Niederlande)
SEPP ELISA	ICI Immuno intelligence GmbH (Berlin)

Tabelle 4. Geräte

Name	Hersteller
Analysenwaage CP 423S	Sartorius (Göttingen)
Autoklav Varioklav	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
CO2-Brutschrank Heracell	Heraeus Sepatech (Osterode)
CO2-Inkubator CB210 mit N2/O2-Regulierung	Binder (Tuttlingen)

Elektrophoresekammern	Bio-Rad (Hercules, USA) bzw. Roth (Karlsruhe)
Hydroflex Washer	Tecan Group (Maennedorf, Schweiz)
Kühlzentrifugen 5417R und 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Magnetrührer M 32	GLW (Würzburg)
Megafuge 1.0 R	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Mithras LB940	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
NanoQuant	Tecan Group (Maennedorf, Schweiz)
PCR-Cycler Primus 25 und 96plus	MWG Biotech (Ebersberg)
Personal spin vortex microspin FV-2400	Lab4you (Berlin)
pH-Meter	inoLab Benchtop WTW (Weilheim)
Photometer NanoDrop 1000	peQ Lab (Erlangen)
Pipetten Eppendorf research (2,5µl, 20µl, 200µl, 1000	Eppendorf (Hamburg)
Präparierbesteck	FST Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
qPCR-Cycler iCycler	Bio-Rad (Hercules, USA)
Reinstwasser-Anlage EASYPure UVTM	Barnstead Int. (Dubuque, USA)
Röntgenfilmkassette	Kodak (Rochester, USA)
S2 Picofox	Bruker Nano GmbH (Berlin)
Specord 205	Analytik Jena (Jena)
Speedvac-Konzentrator Speedvac SC110	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Spektrophotometer Spectrophotometer U-2001	Hitachi, Deutschland
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Sepatech (Osterode)
Sterilbank Lamin Air HB 2448	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tiefkühler profiline und Comfort	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Transferblotapparatur TransblotSD	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Ultraschallprozessor Labsonic	Sartorius (Göttingen)
UV-Transilluminator V-90 M	Benda (Weisloch)
Vortex	Eppendorf (Hamburg)
Waagen CP 2201	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad Modell 1083	GFL (Burgwedel)

2.1.6 Software und Datenbanken

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden die in der folgenden Tabelle dargestellten Programme benutzt (Tabelle 5).

Tabelle 5. Software und Datenbanken

Name	Hersteller bzw. Internetadresse
Adobe Photoshop und Illustrator	Adobe Systems (Kalifornien, USA)
Bio-Rad iCycler iQ 3.0	Bio-Rad Laboratories (Kalifornien, USA)
BioEdit	Ibis Biosciences (Carlsbad, USA)
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
Endnote	Thomas Reuters (New York, USA)
Ensemble	http://www.ensembl.org
Graphpad Prism	GraphPad Software, Inc. (Kalifornien, USA)
Image J	(Schneider et al. 2012)
Microsoft Office	Micorsoft (Washington, USA)
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Primer3 Plus	http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3
SPSS2 Statistics	IBM (Armonk, USA)
Vector NTI 6	Life technologies (Carlsbad, USA)

2.1.7 Hepatisches Karzinommodell

Ein Mausmodell des hepatischen Karzinoms wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe von PD Dr. Thorsten Cramer (Charité – Universitätsmedizin Berlin) bearbeitet. Dort erfolgte die Mausezucht und am Institut für Experimentelle Endokrinologie die Probenanalyse. Der Mausstamm (Hintergrund C57bl/6J) exprimiert das Onkoprotein SV40 large T auf dem Y-Chromosom unter der Kontrolle des murinen Antithrombin III Promoters, welcher spezifisch in der Leber exprimiert wird. Diese Mäuse wurden mit einem geflochtenen HIF1 α Mausstamm gekreuzt, in dem bei beiden Allelen das Exon 2 dieses Gens mit 2 loxP Stellen flankiert war. Durch erneutes Einkreuzen einer Mauslinie, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des leberspezifischen Albumin Promoters exprimiert, wurden Männchen mit Lebertumor mit

und ohne HIF1 α und Weibchen ohne Lebertumore mit und ohne HIF1 α gezüchtet (Daskalow et al. 2010).

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung und Lagerung

2.2.1.1 RNA Isolation

Die mRNA wurde aus einer Kombination von dem Standardverfahren mittels Guanidinisothiocyanat (GTC)-Phenol-Chloroform-Lösung (Chomczynski and Sacchi 1987) und einer Säulenaufreinigung (Promega) gewonnen. Das Aufschließen der Zellen erfolgte mit Trizol (i.e. 1 mL bei einer Fläche von 9,6 cm² Zellen). Nach dem Überführen in ein geeignetes Reaktionsgefäß (i.e. 1,5 mL Eppendorf Gefäß) wurden 200 μ l Chloroform dazugegeben. Mittels eines Zentrifugationsschritts (5 min bei 14.000 rpm) wurde die wässrige von der organischen Phase getrennt. Die wässrige Phase wurde nach Zugabe von 500 μ l Isopropanol auf eine Säule gegeben und nach mehrmaligen Waschschritten nach Herstellerangaben in RNase freiem Wasser eluiert. Die Konzentration wurde abschließend am Nanodrop 1000 photometrisch quantifiziert und die RNA bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 DNA Plasmid Isolation

Das Prinzip der Plasmid DNA Gewinnung beruht auf der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly 1979). Eine beliebig große Menge plasmidtragender DH5 α Bakterien wurde über Nacht in LB Broth (Roth, Karlsruhe) kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation (1000 rpm für 10 min) pelletiert und in Puffer 1 des Plasmid Midi Kits (Promega, Madison, USA) resuspendiert. Die Zugabe von Puffer 2 führte zur bakteriellen Lyse und dem Dissoziieren von DNA. Dieser Schritt erfolgte auf Eis und war kritisch für den Erfolg der Methode. Durch Zugabe von Puffer 3 wurde das Gemisch neutralisiert und die Plasmid DNA konnte im Gegensatz zur genomischen DNA wieder assoziieren. Dieses Gemisch aus Plasmid DNA und Zelltrümmern wurde zentrifugiert und anschließend mittels Vakuum auf Säulen (Promega, Madison, USA) gewaschen und von Endotoxinen befreit. Im letzten Schritt wurde die Plasmid DNA mit destilliertem Wasser eluiert. Plasmide wurden nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung bei -20°C gelagert. Plasmidtragende Bakterienkulturen wurden in 25% Glycerol bei -80°C konserviert.

Kleine Mengen von 2-4 mL Bakterienkultur wurden mit dem Kit „Fast Plasmid™ Mini“ (Eppendorf) nach Herstellerangaben gewonnen.

2.2.1.3 Proteingewinnung

2.2.1.3.1 Differentielle Zentrifugation

Die Proteingewinnung erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit einem schonenden Homogenisations-Puffer durch Schaben abgelöst. Mit 10 Ultraschall-Sonifikationsschritten wurden die Zellen anschließend aufgeschlossen. Bei Bedarf wurde dieses Gesamthomogenat mittels Western Blot aufgetrennt und analysiert. Alternativ wurden spezifische Enzymassays durchgeführt. Bei Bedarf erfolgte hierbei zunächst eine differentielle Zentrifugation (14.000 rpm für 10 min), um das Homogenat in eine zytosolische Fraktion (Überstand) und eine membranhaltige Fraktion (Pellet) aufgeteilt. Die membranhaltige Fraktion wurde in einem RIPA Puffer lysiert. Zur Vorbereitung der Western Blot Analysen wurde jede Probe mit DTT haltigem 4xProbenpuffer versetzt und bei 95°C aufgeköcht, so dass die Proteine denaturieren und ihre Tertiär- und Sekundärstruktur verloren.

2.2.1.3.2 Proteine für enzymatische Assays

Proteinextrakte für die Selenoprotein-Enzymassays bedurften einer speziellen Vorbehandlung. Proben zur DIO-Aktivitätsbestimmung bestanden aus Gesamtzelllysat in Homogenisationspuffer mit 1 mM Dithiothreitol (DTT) als artifizielles Kosubstrat. GPX4 Aktivität wurde aus der Membranfraktion mit Homogenisationspuffer ohne DTT gemessen, und die GPX Aktivitäten der GPX1, 2 und 3 wurde in Gesamtzelllysaten bestimmt und in Homogenisationspuffer ohne DTT gemessen.

2.2.1.4 Mäuse Serum

Zur Gewinnung von Mausserum wurden die Mäuse mittels Stickstoff getötet. Den Mäusen wurde die Bauchdecke geöffnet und das Herzventrikel angeschnitten. Dies führte zu starkem Bluten in den Bauchraum, von wo das Blut in geeignete 1,5 mL Gefäße überführt wurde. Das Blut wurde auf Eis für 15 Minuten zur Gerinnung stehen gelassen, ehe das Serum nach einem Zentrifugationsschritt bei 14 000 rpm für 10 min bei 4 °C vom Blutkuchen getrennt und umpipetiert wurde. Serum Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.2.1 qPCR

In der Selenoprotein Biologie entspricht die mRNA Regulation nicht immer der Protein Menge oder Aktivität. Dennoch ist die quantitative Bestimmung von mRNA unerlässlich, um einen guten Eindruck von den Regulationsmechanismen der Familie von Selenoproteinen zu bekommen.

2.2.2.1.1 Primer Design

Die quantitative Bestimmung von RNA Transkriptmengen erfolgte über die Real Time PCR (RT-PCR). Zur Amplifikation wurden Oligonukleotide mit Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) designed. Primer mussten eine Reihe von Anforderungen erfüllen; sie sollten zwischen 20 und 22 Nucleotiden lang sein, eine Schmelztemperatur (T_m) von 58°C besitzen und idealerweise Intron-überspannend sein.

2.2.2.1.2 cDNA Synthese

Die zu quantifizierende mRNA ist instabil und anfällig für die enzymatische Degradation durch RNAsen. Daher wurde in einem Schritt die mRNA in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das Enzym Reverse-Transkriptase aus MMLV (Maus Molony-Leukämie Virus) verwendet, welches in der Natur von RNA Viren eingesetzt wird, um nach Infektion einer Host Zelle ihr Genom in ablesbare DNA umzuschreiben. Das iScriptTM cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA) konnte eine Menge von 100 fg bis 1 µg totale RNA umschreiben. In der Regel lag die eingesetzte mRNA Menge zwischen 100 ng und 1 µg. Eine Mischung aus zufällig bindenden Hexameren und polydT Primern wurde mit der mRNA, der Reversen Transkriptase und dNTPs den Herstellerangaben entsprechend inkubiert. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.2.1.3 qPCR/Real-Time PCR

Die quantitative Bestimmung der Transkriptmenge beruht auf dem Cyanin Farbstoff SYBR Green, welcher als interkalierende Agenz in Anwesenheit von doppelsträngiger DNA blaues Licht absorbierte und grünes emittierte. Mit jeder PCR Transkriptamplifikation verdoppelte sich das Signal. Der Ct Wert spiegelte den Zyklus wider, an dem das Signal über dem Rauschen zu detektieren war. Je mehr Transkript vorliegt, desto geringer ist der Ct Wert. Mit Hilfe der

Normalisierung auf einen idealerweise nicht regulierten Housekeeper ließen sich die Transkriptmengen bei unterschiedlicher Behandlung miteinander vergleichen.

Die cDNA wurde in einem ersten Schritt stark verdünnt (1:20 bis 1:40), dann wurden 5 µl verdünnte cDNA mit 0,25 µl Primern [10µM], 5 µl SybrGreen Mix und 4,5 µl Wasser vermischt. Jede Probe wurde als Duplikat vermessen. Das PCR Programm folgte dem Schema:

Tabelle 6

Programmschritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95°C	15 min
2. Denaturierung	95°C	15 sec
3. Primer Annealing	58°C	30 sec
4. Elongation	72°C	30 sec
5. Finale Elongation	72°C	3 min

Die Schritte 2-4 wurden 50 x wiederholt

Anschließend folgte beim Etablieren der Primer eine Schmelzkurvenanalyse und die PCR Produkte wurden auf Doppelbanden hin in einem Agarose Gel untersucht. Für die Berechnung wurde der Mittelwert aus den Ct Werten der Duplikatbestimmungen gebildet. Der ΔCt Wert ergab sich aus der Differenz zwischen dem zu untersuchenden Transkript und den Ct-Werten des Housekeepers. Bei RT-PCR Analysen empfiehlt es sich, Mehrfachbestimmungen einer Behandlung zu machen (i.e. n=4 Normoxie Proben und n=4 Hypoxie Proben). Nun wurde die Kontrollgruppe auf 1.0 (z.B. Normoxie) gesetzt und der „fold change“ der anderen Gruppen (z.B. Hypoxie) zu dieser Gruppe berechnet, woraus sich der $\Delta\Delta Ct$ Wert errechnete.

2.2.2.2 Klonierung

Die Klonierung von Genen erlaubt die Expression von Proteinen oder eine gezielte Modifikation der Aminosäure-Sequenz mit anschließender Expression. Durch das Klonieren von Promotoren vor ein Reportergen, z.B. eine Luciferase, lässt sich die Regulation dieser Promotorabschnitte *in vitro* studieren.

2.2.2.2.1 Promotersequenzklonierung aus genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit 50 ng pro PCR Reaktion eingesetzt, jeweils 0,25 µl von 10 nM der flankierenden Primer, welche mit 18 bp die zu amplifizierende Region überlappten und eine Restriktionsschnittstelle sowie drei Basen Überhang am 5'-Ende beinhalteten, welches später die gezielte Insertion in das Reporterplasmid erlaubte (Tabelle S2). Außerdem wurden zu jeder Reaktion 10µl 2,5 X Taq mix (Eppendorf, Hamburg), welcher die Polymerase beinhaltete, sowie 13,5 µl destilliertes Wasser zugegeben. Nach 35 Zyklen PCR Amplifikation wurde die korrekte Amplifikation in einem Agarose Gel kontrolliert. Entscheidend war die richtige Primer

Annealing Temperatur, welche sich je nach Region und GC Gehalt stark unterschied. Alle Programme folgten dem gleichen Prinzip (Tabelle 7).

Tabelle 7

Programmschritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95°C	15 min
2. Denaturierung	95°C	30 Sek
3. Primer Annealing	45-65°C	30 Sek
4. Elongation	65°C	1 Min
5. Finale Elongation	65°C	3 min

Die Schritte 2-4 wurden 35 x wiederholt.

Das PCR Produkt wurde wie beschrieben aufgearbeitet und in das pGL4.1 Plasmid kloniert.

2.2.2.2.2 Umklonierung von HIF1 und HIF2 Plasmiden

Im Unterschied zur PCR Amplifikation von genomischer DNA können Plasmide bei geeigneten Schnittstellen über einen gezielten Restriktionsenzymverdau umkloniert werden. Die vier HIF Varianten wurden von Addgene (Cambridge, Massachusetts, USA) mit einem pCDNA 3.1 Backbone geliefert. Um die Möglichkeit der Lentivirenherstellung mit vereinfachter stabiler Zellliniengenerierung zu ermöglichen, wurden die HIF Varianten mit den Enzymen BamH1 und Not1 verdaut. Die nun ausgeschnittenen Gene wurden durch ein Agarosegel von dem Backbone getrennt. Ebenfalls mit BamH1 und Not1 wurde das pCDH Zielplasmid verdaut und über ein Agarosegel aufgereinigt.

2.2.2.2.3 DNA Agarosegel Aufreinigung

Die DNA trennte sich im Agarose Gel, welches die interkalierende Substanz Ethidiumbromid beinhaltet, nach ihrer Größe auf und wurde mittels UV-Licht sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Skalpels ausgeschnitten. Mit Hilfe des Perfectprep Gel Cleanup kits (Eppendorf) wurde den Herstellerangaben entsprechend die DNA isoliert. Nach dem gleichen Prinzip wurden auch PCR Produkte umgepuffert oder von unspezifischen Banden befreit.

2.2.2.2.4 DNA Ligation

DNA Fragmente können über das Enzyme T4 Ligase (Promega) miteinander verbunden werden. Hierfür wurden 3 Teile des Fragments mit einem Teil Plasmid gemischt und nach Zugabe von 1µl T4 Ligase mit 1µl 10x Fach Puffer bei 4°C über Nacht inkubiert.

2.2.2.2.5 Transformation von chemisch-kompetenten Zellen

Mit Hilfe von Bakterien werden die ligierten Plasmide amplifiziert und anschließend durch Kontrollverdau und Sequenzierung die Insertion bestätigt. DH5 α Bakterien, deren Zellmembran durch eine chemische Behandlung kompetent für die Aufnahme von DNA gemacht wurde, wurden von -80°C auf Eis aufgetaut und mit Plasmid Ligationsgemisch für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf 42°C erhitzt, so dass sich die Membran weitete und die DNA aufnahm. Durch die anschließende Inkubation für 2 Minuten auf Eis zogen sich die Bakterien zusammen. Danach wurden die Bakterien in 1 mL LB Medium ohne Antibiotikaresistenz bei 37°C unter Schütteln inkubiert. In der Zeit bildeten Bakterien durch die aufgenommenen Plasmide eine Antibiotika Resistenz aus. Danach wurden 10-200 μ l Bakterienkultur auf einer Antibiotikum enthaltenden LB-Agarplatte ausplattiert. Im Fall von pCDH oder pGL4.1 wurden 100 μ g/mL Ampicillin verwendet. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C konnten einzelne Klone identifiziert werden. Diese wurden mit einem spitzen, sterilen Gegenstand gepickt und in ein Gefäß mit 3-4 mL LB Medium mit Antibiotikum zur Übernachtinkubation bei 37 °C überführt. Nach der, wie unter 3.2.1.2 beschriebenen Plasmidgewinnung, wurde die Insertion des Fragmentes HIF oder der Promotersequenz durch einen Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen kontrolliert.

2.2.2.3 Sequenzierungen

Mutationsfreiheit der Plasmidesequenzen wurde mittels Sequenzierung kontrolliert. Hierfür wurden 1 μ g Plasmid mit 4 μ l Primer [5 nM] zur Firma LGC Genomics (Berlin) geschickt und dort sequenziert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinbestimmungen mittels Bradford oder BCA Assay

Die exakte Bestimmung von Proteinkonzentrationen ist die Grundlage von Western Blot Analysen oder Enzymassays. Zwei Methoden wurden in dieser Arbeit angewandt, da beide unterschiedlich sensitiv auf interferierende Chemikalien reagieren. Alle Bestimmungen wurden im 96 Well Format durchgeführt.

Beim Bradford Assay bildet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Aminosäuren eine Verbindung. Durch die Komplexbildung kommt es zu einem Farbumschlag, und das photometrische Absorptionsspektrum wandert von 470 auf 595 nm.

Ähnlich verhielt sich die Bicinchoninsäure (BCA), bei der es jedoch nicht direkt zur Komplexbildung mit den Proteinen kommt, sondern eine Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} in alkalischen Lösungen erfolgt, welche linear zur Proteinkonzentration ist. Cu^{1+} Ionen binden an BCA, was zu einem Farbumschlag führt, der bei 562 nm photometrisch quantifiziert werden kann. Bei beiden Varianten wurde Anhand einer Eichgraden mit bekannten Proteinkonzentrationen die exakte Proteinmenge in den zu untersuchenden Lösungen bestimmt.

2.2.3.2 Western Blot Analyse

Die klassische Methode zum Nachweis von Proteinen ist der Immunoblot (Western Blot). Hierbei werden Proteine nach Ihrer Laufgeschwindigkeit in einer Polyacrylamid SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose Membran transferiert, wo sie mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen wurden.

2.2.3.2.1 Polyacrylamid SDS-Gelelektrophorese

Die Proteine erhielten durch das SDS eine negative Ladung und wanderten zu der Anode, wenn durch das Einschalten des elektrischen Stroms eine Spannung in dem Kammersystem angelegt wurde.

Im niedrigprozentigen Sammelgel wurden die Proteine beschleunigt und anschließend konzentriert, sobald sie auf das hochprozentige Trenngel trafen. Dort wurden die Proteine durch eine aus Polyacrylamid hergestellte Matrix ihrer Größe und Form nach aufgetrennt. Kleine Proteine wanderten schnell durch das Geflecht und große Proteine brauchten länger. Durch die Variation des Polyacrylamidanteils im Trenngel ist die Möglichkeit gegeben, Proteine in unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen optimal aufzutrennen (z.B. SePP [72 kDa]: 10 % oder GPX1 [22 kDa]: 15%). Als Richtwert und Kontrolle wurde ein Marker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, Kanada) mit definierten und angefärbten Proteinbanden mit aufgetrennt und geblottet.

2.2.3.2.2 Protein Transfer und Blockierung

Die im Polyacrylamid ihrer Größe nach aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Semi-Dry Blotting Anlage auf eine Nitrocellulose Membran überführt. Hierfür wurde das Gel zwischen zwei in Transferpuffer getränkten Filterkarten mit der Membran geklemmt und für 20-40 Minuten einem Spannungsfeld [bis zu 25 V] ausgesetzt. Die Proteine wanderten zur Anode und blieben auf der Membran. Die Übertragung der Proteine wurde zum einen durch die

gefärbten Proteinbanden des Markers und durch Anfärben aller Proteinbanden durch PonceauS kontrolliert. Die PonceauS Färbung erlaubte die Kontrolle einer quantitativ und qualitativ gleichmäßigen Proteinauftragung, Trennung und Übertragung und diente als erste Überprüfung der sauberen und adäquaten Arbeitsweise in den vorherigen Schritten.

2.2.3.2.3 Immundetektion

Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurde die Menge des Zielproteins in den einzelnen Proben nachgewiesen. Zuerst wurde eine Unterdrückung unspezifischer Bindungen durch eine einstündige Inkubation der Membran mit TBS-T Puffer mit 5% Milchpulver (Roth) erzielt. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper unter ständiger Rotation inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach drei 10 minütigen Waschschritten mit TBS-T Puffer die Inkubation mit dem Horseradish peroxidase (HRP) gekoppelten und gegen die Spezies des primären Antikörper gerichteten sekundären Antikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur, auch unter Rotation. Anschließend wurde wieder 3 mal mit TBS-T Puffer gewaschen und die Proteinbanden mit Hilfe einer ECL Lösung (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK), welche auf die Membran gegeben wurde und das Substrat der HRP darstellte, detektiert. Die enzymatische Aktivität erzeugte ein Lichtsignal, welches mit einem Film detektiert werden konnte. Die entwickelten Filme wurden eingescannt und die Pixelstärke mit dem Programm Image J quantifiziert.

Tabelle 8. Verwendete Antikörper

Antikörper /Spezies	Verdünnung	Hersteller
SePP / Maus	1:2000	ICI Immunochemical intelligence GmbH (Berlin)
Ceruloplasmin / Kaninchen	1:2000	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dejodase 1 / Kaninchen	1:1000	Dr. Gladyshev, Boston, USA
SELS / Kaninchen	1:2000	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
GPX1 / Kaninchen	1:2000	Abcam (Cambridge, UK)
GPX4 / Kaninchen	1:2000	Abcam (Cambridge, UK)
HRP- Beta Actin / Kaninchen	1: 32 0000	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
HRP-Anti Maus	1:2000	GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK)
HRP-Anti Kaninchen	1:2000	Dako (Santa Clara, USA)

2.2.3.3 SePP ELISA

Die SePP Konzentration wurde aus 50 µl Zellkulturüberstand oder Serum bzw. Plasma mit Hilfe des für die SePP Serum und Plasma Spiegelbestimmung etablierten Selenotest[®] (ICI – immunochemical intelligence GmbH, Berlin, Germany) nach Herstellerangaben vermessen.

2.2.3.4 GPX Enzymassay

Die Aktivität der GPX Isoenzyme wurde durch den Verbrauch von NADPH/H⁺ bei einer Wellenlänge von 340 nm photospektrometrisch indirekt gemessen. So katalysieren GPX die Neutralisation von Peroxiden, welche als Isoenzym-spezifische Substrate hinzugegeben werden. Unter dem Verbrauch von Glutathion entsteht Glutathiondisulfid. Die Glutathion Reduktase recycelt Glutathiondisulfid unter dem Verbrauch von NADPH/H⁺. Der Abfall von NADPH/H⁺ ist entsprechend der Aktivität von GPX und dem gebildeten Glutathiondisulfid. In den Küvetten wurden 500 µL Reaktionspuffer [0,2 M Tris, 1mM EDTA, 0,33 mg/ml NADPH, 4,6 mM GSH und 2 U/mL rekombinante Glutathion Reduktase] mit 500 µl Wasser und 10 – 20 µl Proteinlysat vermischt. Mit Hilfe von 100 µl Mercapto-Succinate [15 mg/mL] wurde die Reaktion blockiert und der Hintergrund bestimmt. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 10 µL Substrat (für GPX1, 2 und 3 je 1:1000 verdünntes 70% tertBuOOH; GPX4 1:2000 verdünntes Cumen Hydroperoxid) gestartet und der Verbrauch von NADPH/H⁺ über die Zeit pro Probe im Duplikat gemessen. Am Ende wurde der Hintergrund von jeder Probe abgezogen. Die Aktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{GPX-Aktivität}}{[\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})]} = \frac{\Delta E_{340} / \text{min} \cdot V_{\text{Ansatz}}}{6200 [M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \cdot d[\text{cm}] \cdot m_{\text{Protein}}[\text{mg}]}$$

V_{Ansatz} = Gesamtansatzvolumen

ΔE_{340} = Extinktionsänderung pro min bei 340 nm

M_{Protein} = Protein im Ansatz in mg

d = Küvettendurchmesser

2.2.3.5 Deiodase Enzym Assay

Der Goldstandard der DIO Aktivitätsbestimmung war lange Zeit die Quantifizierung der enzymatisch katalysierten Freisetzung von radioaktivem Jod, welches durch Dejodierung von radioaktiven Schilddrüsenhormonen freigesetzt wurde. Die Entwicklung eines nicht-radioaktiven DIO Assays basierte auf der Sandell-Kolthoff Reaktion (Renko et al. 2012). Die Probenvorbereitung ist unter 3.2.1.3.2. beschrieben. Alle Proben wurden auf 1 µg/µl Proteinkonzentration eingestellt.

40 µg Protein wurden in jede Reaktion eingesetzt. Als Hintergrundkontrolle fungierte eine Probe mit 10 mM des DIO 1 Inhibitors PTU. Zu jeder Probe wurden ein Substratmix aus 1 µl rT3 [1mM], 10 µl KPO₄ Puffer pH 6,8, 4 µl DTT [1M] und 35 µl ultrareines Wasser gegeben. Die Reaktionen wurden für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 15 000 g zentrifugiert. Das im Überstand befindliche Jod wurde abgenommen und quantifiziert. Mit Hilfe von Dowex W50-X2 Resins wurde das intakte und dejodierte rT3 von dem freiem Jod getrennt. Nach dem Mischen von 50 µl Überstand und 100 µl Essigsäure (10%) wurde das freie Jod eluiert und 1:4 mit 10% Essigsäure verdünnt. Die Sandell-Kolfthoff Reaktion entfärbt eine Cerium Arsenit Lösung in Abhängigkeit von Jod, welches bei 415 nm Wellenlänge quantifiziert wird. 50 µl einer ceriumhaltigen Lösung [22 mM (NH₄)₄Ce(SO₄)₄ und 0,44 M H₂SO₄] wurde zu den verdünnten Eluaten gegeben. Mit der Zugabe von 50 µl einer arsenhaltigen Lösung [25 mM NaAsO₂, 0,8 M NaCl und 0,5 M H₂SO₄] wurde die Reaktion gestartet und in einem Mikrotiterplatten Lesegerät (BioRad) kontinuierlich für 21 Minuten quantifiziert. Die Veränderung in der optischen Dichte vom ersten zum letzten Zeitpunkt spiegeln die freigesetzte Jodmenge wider und damit die DIO Aktivität in den Zellen. Von jeder Probe wurde der Hintergrund abgezogen.

2.2.4 Se/Spurenelement Messung mittels TXRF

Die Totalreflektions-Röntgenfluoreszenzanalytik (TXRF) ist eine geeignete Methode zur Bestimmung von Spurenelementen aus kleinen Probenmengen. Der S2 Picofox von Bruker Nano GmbH (Berlin) ist ein TXRF-Gerät, welches sich durch eine enorme Sensitivität auszeichnet. Röntgenstrahlen werden in einem ganz flachen Winkel auf die zu analysierende Probe fokussiert, wodurch ein tiefes Eindringen der Röntgenstrahlen in die Probe und den Probenträger verhindert wird. Durch die Bestrahlung der Probe werden kernnahe Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben, welche dann beim Zurücksinken Fluoreszenzlicht emittieren, welches durch den Detektor des Gerätes quantifiziert wird. Serumproben werden mit einem internen Standard mit definierter Konzentration vermischt (hier: Gallium) und auf den Objektträger aus Quarz pipettiert und trocknen gelassen. Anschließend können die Spurenelemente wie oben beschrieben im S2 Picofox analysiert und anhand des internen Standards quantifiziert werden (Mittag et al. 2010).

2.2.5 Zellkultur

Das Arbeiten mit primären oder immortalisierten, meist aus Karzinomen gewonnenen, Zelllinien können zwar nicht das komplexe Zusammenspiel der Organe im menschlichen Körper widerspiegeln, sind aber dennoch in der Forschung unverzichtbar.

2.2.5.1 Stammhaltung und Stimulation

Konfluent gewachsene HepG2 Zellen wurden nach Abnahme des Mediums mit 10 mL PBS gewaschen und mit 1 mL Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst. Nach Aufnahme der Zellen in FKS haltiges Medium wurden die Zellen vereinzelt und für den Versuch oder die Stammhaltung entsprechend verdünnt und ausplattiert. Einen Tag vor Start der Experimente wurden die HepG2 Zellen oder primären humanen MSC auf Zellkulturschalen ausgesät. Am Tag des Experiments wurde das Medium gewechselt und mit Natrium Selenit, IL-6 oder Glutamin entsprechend der Legendenbeschreibung in den Abbildungen versetzt.

Hypoxie wurde in dem Zellkulturschrank mit 1% O₂ Gehalt simuliert. Die IL-6 Signalkaskade wurde bei einer Konzentration von 100 ng/mL IL-6 stimuliert. Glutamin wurde in Glutamin freies Medium in den Konzentrationen 0,2 und 2 mM zu den HepG2 Zellen gegeben.

2.2.5.2 Plasmid Transfektion in Säugerzellen

Mit Hilfe des Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI) (Polysciences, Inc, Warrington, Pennsylvania, USA) ließen sich Plasmide in HepG2 Zellen zur transienten Expression *in-vitro* transfizieren. Hierfür wurde bei einer Oberfläche von z.B. 9,6 cm² je 2 µg Plasmid DNA, 200 µl RPMI Medium ohne FKS und Antibiotika mit 5 µl PEI 25 (1µg/ml) gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Gemisch auf die Zellen in 2 mL Medium mit FKS und Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 48 Stunden mit frischem Medium im Zellkulturschrank inkubiert.

2.2.5.3 Reportergenassay

Mit Hilfe von in HepG2 Zellen transfizierten Reportergenplasmiden wurden zum einen die Promoterregulation von Selenoproteinen durch Stimulation wie Hypoxie untersucht, und zum anderen dienten sie dem Nachweis der spezifischen IL6 vermittelten JAK-STAT Antwort und der HIF induzierten HRE Aktivierung. Das Protokoll wurde von Hofmann *et al.* adaptiert (Hofmann et al. 2009). Am ersten Tag wurden 10 µl RPMI ohne FKS und Antibiotikum mit 0,095 µg Reporterplasmid und 0,0025 µg Normalisierungsplasmiden (pGL4.75 Renilla und

pSEAP2-Control) und 0,25 µl PEI 25 gemischt und nach 15 Minuten Inkubation mit 20.000 HepG2 Zellen in 90 µl DMEM F12 Medium mit FKS und Antibiotika vermischt und in ein Well einer 96 Well Platte gegeben. In der Regel wurden Mehrfachbestimmungen durchgeführt und die Volumina demensprechend erhöht. Nach 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 20% O₂ wurden die Zellen gewaschen und das Medium gewechselt (selenhaltig oder mit dem Zytokin IL6 ohne FKS und Antibiotika). Danach wurden die Zellen bei entsprechenden Bedingungen z.B. Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Aktivität von Luciferase, Renilla und der sekretierten SEAP bestimmt. Für SEAP wurden 50 µl Überstand in eine neue weiße 96-Well Platte pipettiert und mit 1:5 in SEAP Puffer verdünntem SEAP Substrat (Applied Biosystems) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Bestimmung der intrazellulären Renilla und Luciferase Aktivität wurden die Zellen in der 96-Well Zellkulturplatte von Medium befreit und mit 20 µl 1x Protein Lysisbuffer (Promega, Mannheim) für 10-20 Minuten bei 900 rpm auf dem Schüttler lysiert. Anschließend wurden sowohl die SEAP als auch die Renilla und Luciferase Aktivitäten auf dem Berthold Mitras Luminometer bestimmt. SEAP Lumineszenz konnte direkt gemessen werden. Die Luciferase Aktivität wurde nach der Injektion von 20 µl Luciferin-haltigem Substrat (Luciferase Assay Substrat von Promega) und anschließend die Renilla Aktivität nach der Injektion von 20 µl Coelenterazine haltigem Renilla Substrat (Stop & Glo[®] Substrat von Promega) gemessen. Die Ergebnisse wurden als RLU (relative light units) abgebildet. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte durch eine Normalisierung auf die Transfektionseffizienz mittels SEAP oder Renilla Aktivität. Ergebnisse wurden auf die Kontrollbehandlung (i.e. Normoxie) normiert.

2.3 Statistik

Zur statistischen Berechnung und Darstellung der erhobenen Daten wurden unterschiedliche Programme benutzt. Sobald genügend Datenpunkte (i.e. mehr als 4) in einer Gruppe vorhanden waren, wurde mit der Software IBM SPSS Statistics mittels des Kolmogorow-Smirnow-Tests auf Normalverteilung überprüft. Anschließend wurden die Daten mit den in der Legende angebenen geeigneten Tests auf Unterschiede überprüft. Abbildungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism erstellt und die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Die kompletten statistischen Auswertungen der Studie zur Bedeutung von Se bei Polytrauma-Patienten werden von den Kollegen der LMU München durchgeführt. In dieser Arbeit sind die ersten präliminieren Daten gezeigt.

Die Berechnungen zur Implementierung der klinischen Studie wurden gemeinsam mit dem Biostatistiker Dr. Eddy Rijntjes durchgeführt. Hierbei wurde die Gesamt-Gruppengröße von 96 Neugeborenen mittels F - Test berechnet (80% Power und $\alpha = 0,05$; G-POWER 2 für ANOVA). Dafür wurden Selenspiegel von Neugeborenen aus der Literatur zugrunde gelegt (45 $\mu\text{g/L}$ bei einer Standardabweichung von 13 $\mu\text{g/L}$) (Loui et al. 2010, Makhoul et al. 2004). Bei vier Gruppen von männlichen und weiblichen Neugeborenen, sowie einem Studienarm für Kinder mit und ohne Infektion, ergab dies 24 Kinder pro Gruppe, bei der Annahme das 20% Unterschied klinisch signifikant sind.

3. Ergebnisse

3.1 Regulation von Selenoproteinen und der Selenoproteinbiosynthese durch Hypoxie

3.1.1 Hypoxie Nachweis in vitro

Humane hepatokarzinome HepG2 Zellen wurden für 72 Stunden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen mit und ohne Supplementation (0 nM vs. 100 nM Natrium Selenit) kultiviert. Anschließend wurde die Expression von HIF Zielgenen mittels RT-PCR quantifiziert. Zusätzlich wurden die hypoxischen Bedingungen über einen Zeitraum von 24 Stunden mit einem HRE-Luciferase Reporterkonstrukt im Vergleich zu einem STAT3 Reporter quantifiziert (Abbildung 7).

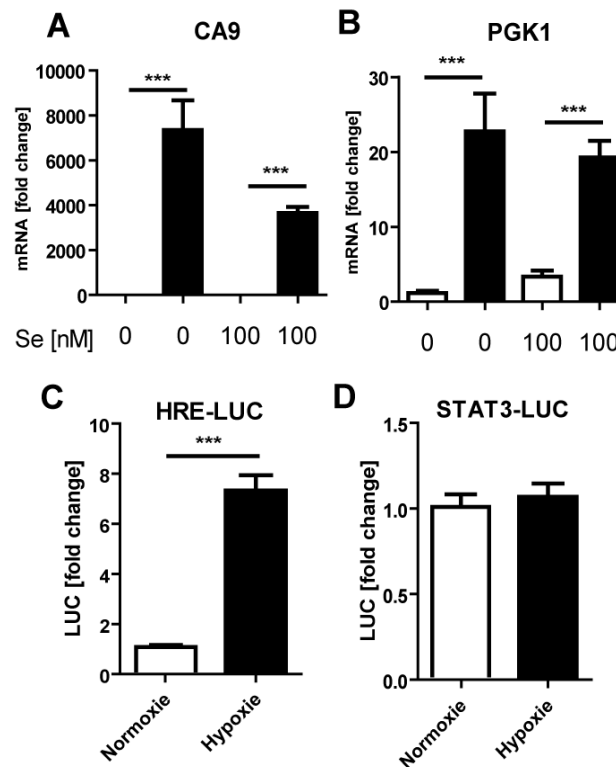


Abbildung 7. Hypoxie induziert *C9A* und *PDG1* Genexpression und HRE-Luciferase-aktivität. (A+B) Mittels RT-PCR konnte die Transkriptmenge der beiden Hypoxiemarker *C9A* und *PGK1* quantifiziert werden (n=4). Hypoxische Proben sind in schwarzen Balken und normoxische Proben in weißen Balken dargestellt. Zur Normalisierung diente die Expression der 18S rRNA. (C+D) In einem Reporteragen-Assay wurde die spezifische HIF-Aktivität während der Hypoxie quantifiziert. (Statistik: Students' T-test $p \leq 0,001$ ***).

Die Carbonic Anhydrase 9 (CA9) ist ein klassisches HIF Zielgen. CA9 katalysiert die Reaktion von CO_2 und Wasser zu H^+ Ionen und Bicarbonat (HCO_3^-) und wieder zurück, welches das saure Milieu zu neutralisieren vermag (Swietach et al. 2010). Phosphoglycerat Kinase 1 (PGK1) ist ein glykolytisches Enzym und HIF Zielgen (Semenza et al. 1994). Diese beiden Enzyme wurden signifikant in HepG2 Zellen unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert. Interessanterweise zeigte sich durch die Se-Supplementation eine leicht verminderte Heraufregulation, die besonders ausgeprägt bei *CA9* war. Die Hypoxieantwort in dem Zellkultursystem wirkte spezifisch mit einer 7-fachen Induktion auf den HRE-Reporter. Der STAT3 Signalweg wurde unter diesen Bedingungen nicht angesprochen. Zusammenfassend konnte Hypoxie sehr gut in dem gewählten Model dargestellt und nachgewiesen werden.

3.1.2 SePP wird durch Hypoxie reguliert

SePP ist der zentrale Selentransporter im menschlichen Organismus. In der Zellkultur produzierten nur humane HepG2 Zellen gut nachweisbare Mengen SePP, was gut zu der physiologischen Bedeutung der Leber als Syntheseorgan von SePP passt. Daher wurde der Effekt von Hypoxie auf die SePP Expression in diesem Model untersucht. HepG2 Zellen

wurden 72 Stunden bei normoxischen und hypoxischen Bedingungen mit steigenden Konzentrationen von Se (0, 10, 100 nM) und dem Aminoglykosid Geniticin (G418; 10 und 100 µg/ml) kultiviert. Danach wurde die mRNA Expression sowie die Menge sezernierten Proteins aus dem Medium quantifiziert. Die intrazelluläre SePP Protein Expression wurde nach 48 Stunden quantifiziert (Abbildung 8).

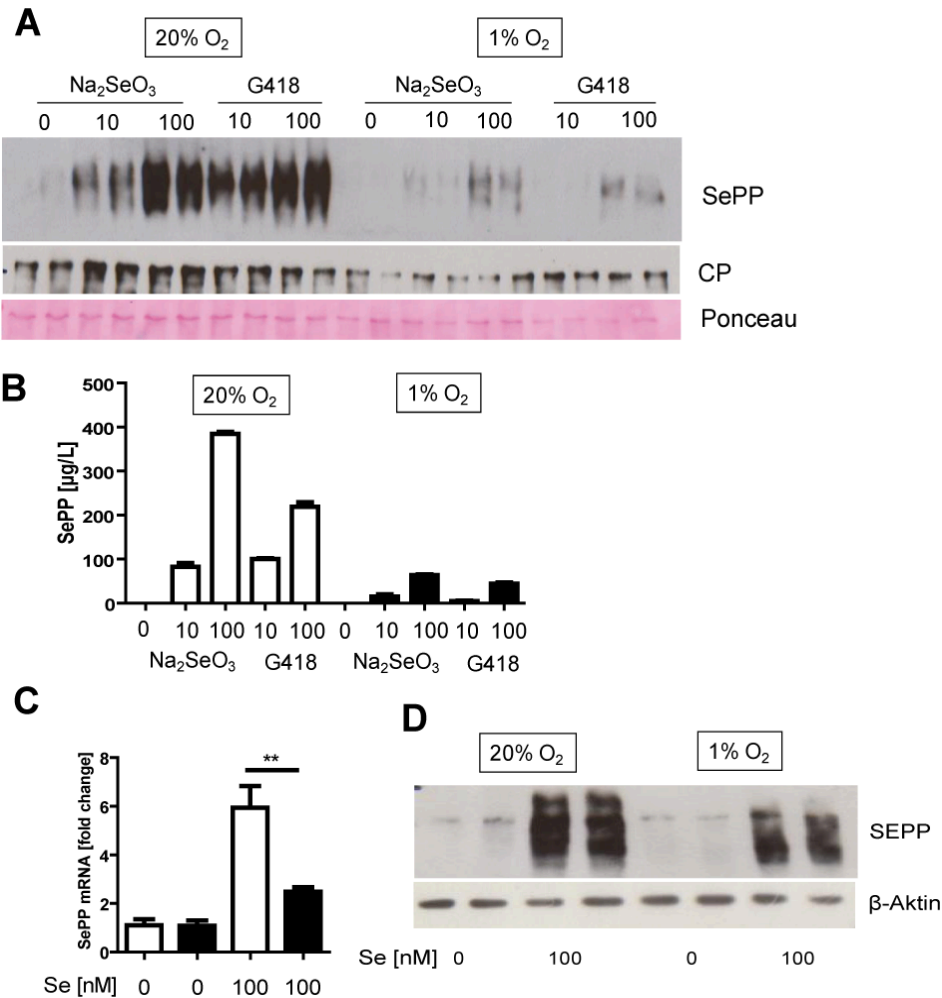


Abbildung 8: Hypoxie reguliert die SePP Expression herunter. (A) Western Blot Protein Quantifizierung der SePP Expression bei Hypoxie und Normoxie nach Kultivierung über 72 Stunden unter Se-armen und -reichen Bedingungen, sowie Stimulation des UGA-Codon Überlesens durch G418. Gleiche Mengen Medium wurden aufgetragen. Zur Protein Normalisierung dienten der Kupfer-Transporter Ceruloplasmin (CP) und die Proteinfärbung mittels Ponceau Rot. (B) Die gleiche Hypoxie bedingte Herunterregulation der SePP Expression im Medium zeigte sich in einer Selenoprotein P ELISA Quantifizierung (n=2). (C) Die mRNA wurde mittels RT-PCR quantifiziert und zeigte eine signifikante Erniedrigung der Expression unter Hypoxie (schwarzer Balken) im Vergleich zu Normoxie (weißer Balken). Normalisiert wurde auf die 18S rRNA Expression (n=4). (D) Intrazelluläre SePP Western Blot Quantifizierung zeigte ebenfalls eine Herunterregulation nach 48 Stunden Hypoxie. Protein Konzentrationen wurden auf den Housekeeper β -Aktin Normalisiert. (Statistik: Student's T-test $p \leq 0,01^{**}$).

Eine Supplementation mit Se konnte die SePP Sekretion in HepG2 Zellen unter hypoxischen Bedingungen nicht wieder herstellen. Dieser Effekt wurde durch die global verminderte Sekretion unter Hypoxie verstärkt. Sowohl der Kupfertransporter Ceruloplasmin als auch die gesamte Protein Menge auf der Western Blot Membran waren unter Hypoxie erniedrigt. Auf

mRNA Ebene zeigte sich nach Se-Supplementation eine verminderte *SePP* Expression, was für einen spezifischen Regulationsmechanismus sprach. Se wurde unter Hypoxie nicht in Form von SePP intrazellulär gespeichert.

3.1.3 Regulation der DIO 1 durch Hypoxie

Der Schilddrüsenhormonmetabolismus wird durch DIOs kontrolliert. Bei schweren Erkrankungen kommt es zur so genannten „Non-Thyroidal Illness“ oder zum „Low T3 Syndrom“, deren Ätiologie noch nicht verstanden ist (Boelen et al. 2011). Die Leber ist das Hauptorgan der DIO1 Expression. Daher wurde die DIO1 Aktivität und Expression von mRNA und Protein in dem HepG2 Hypoxie Model nach 72 bzw. 48 Stunden untersucht (Abbildung 9).

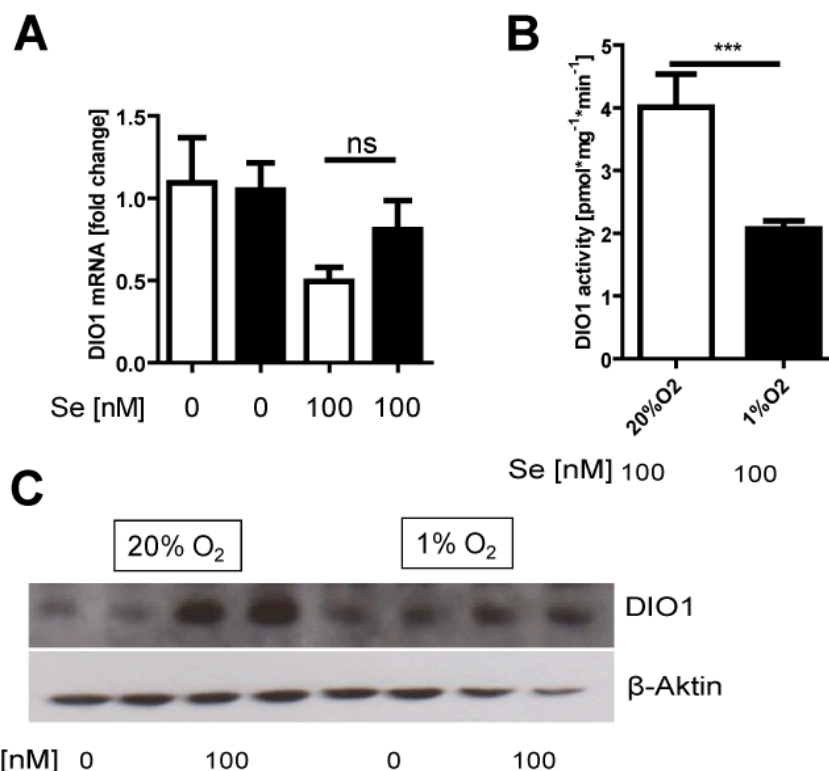


Abbildung 9: Hypoxie reguliert die DIO1 Expression und Aktivität herunter. (A) DIO1 mRNA, quantifiziert mittels RT-PCR und normalisiert auf 18S rRNA, ist nach 72 Stunden Hypoxie (schwarze Balken) nicht signifikant im Vergleich zur Normoxie (weiße Balken) reguliert (n=4). (B) Die DIO1 Aktivität wurde in einem nicht radioaktiven Assay quantifiziert (n=6) und war Hypoxie-abhängig. (C) Ebenfalls war die DIO1 Expression im Western Blot nach 48 Stunden Hypoxie Kultivierung vermindert. (Statistik: Students T-test: ns=nicht signifikant; ***=p<0,001).

Anders als SePP zeigte die *DIO1* mRNA keine Regulation nach Hypoxie-Induktion. Jedoch sank die DIO1 Aktivität um 50% unter hypoxischen Bedingungen, wenn ausreichend Selen für eine detektierbare Expression vorhanden war. Die Aktivität ließ sich unter nicht

supplementierten Bedingungen nicht zuverlässig quantifizieren. Dies machte auch die starke Induktion der Protein Expression durch Se unter normoxischen Bedingungen deutlich.

3.1.4 SelS wird durch Hypoxie reguliert

Eine wichtige Schnittstelle zwischen dem Selenstatus und dem Immunsystem hat das im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte SelS inne (Stoedter et al. 2010, Curran et al. 2005). Die Regulation von SelS durch Hypoxie ist bisher noch nicht untersucht. Nach 72 Stunden unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen wurde die mRNA und Protein Expression in HepG2 Zellen quantifiziert. Die Membranfraktion wurde durch differentielle Zentrifugation grob angereichert (Abbildung 10).

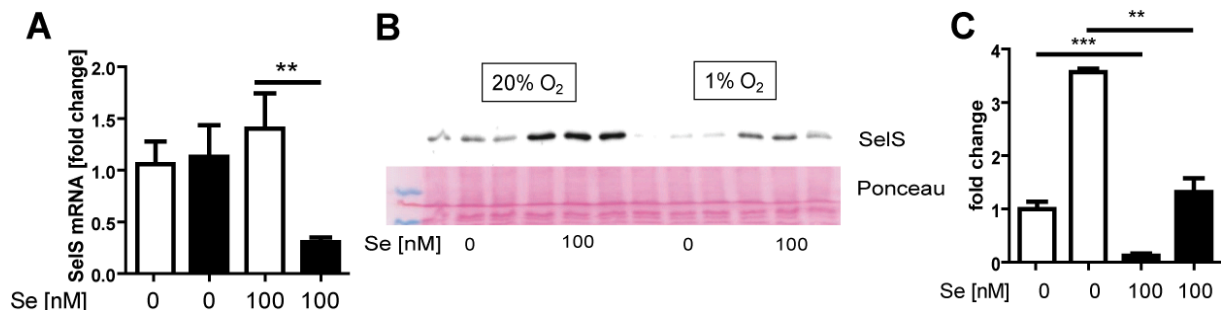


Abbildung 10: Selenoprotein S wird unter Hypoxie herunterreguliert. (A) Hypoxie (schwarze Balken) verursachte im Vergleich zur Normoxie (weiße Balken) nach 72 Stunden Se-reichen Bedingungen (100 nM) eine signifikante verminderte *Selenoprotein S* mRNA Expression (n=4). 18S rRNA diente der Normalisierung. (B) Die Selenoprotein S Expression in der Membranfraktion war im Western Blot bei Se-armen (0 nM) und reichen (100 nM) Bedingungen unter Hypoxie herunterreguliert. (C) Die Westernblot-Quantifizierung verdeutlichte den Effekt von Hypoxie auf die SELS Expression. Signalstärke der Proteinbanden wurden mit ClustalW quantifiziert (Statistik: Students T-test $p \leq 0,01^{**}$ und $p \leq 0,001^{***}$).

Ähnlich wie bei der *SePP* mRNA zeigte sich nur bei Se-Supplementation eine signifikante *SelS* mRNA Herunterregulation während der Hypoxie. Die Protein Expression war sowohl mit und ohne Se-Supplementation durch Hypoxie vermindert.

3.1.5 Glutathion Peroxidasen werden differentiell durch Hypoxie reguliert

Die Glutathion Peroxidasen bilden die größte Gruppe der Selenoproteine. Sie sind direkt verantwortlich für den Abbau von Peroxiden, die eine Vorstufe von ROS darstellen, und regulieren die intrazelluläre Redox-Homöostase (Brigelius-Flohe and Maiorino 2013). HepG2 Zellen wurden 72 Stunden mit und ohne Se unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen kultiviert, anschließend wurde die GPX-Aktivität in einem Enzym-Assay quantifiziert. Nach dem gleichen Versuchsaufbau wurde die zytosolische GPX1 Protein Expression nach 48 Stunden quantifiziert (Abbildung 11).

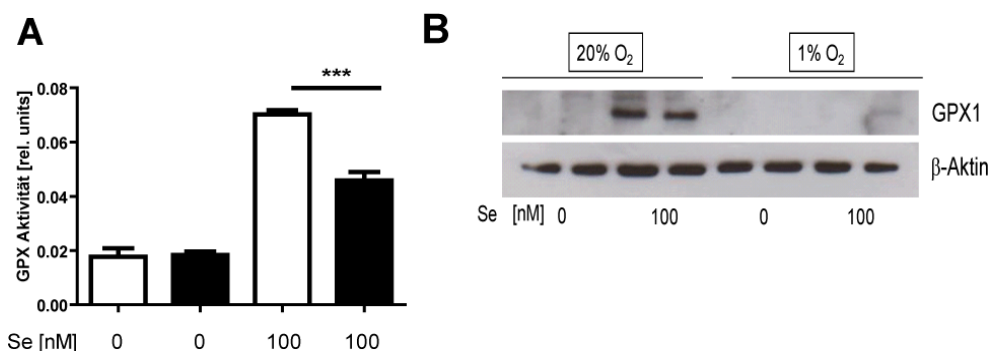


Abbildung 11: Verminderte GPX-Aktivität und GPX1 Expression unter Se-reichen, hypoxischen Bedingungen. (A) Die GPX-Aktivität wurde mit tert-Butyl Hydroperoxid quantifiziert und zeigte nach 72 Stunden hypoxischen Se-supplementierten Bedingungen (schwarze Balken) im Vergleich zu normoxischen Bedingungen (weiße Balken) eine verminderte Aktivität (n=4). (B) Western Blot Analyse der GPX1 Protein Expression zeigt einen starken Anstieg nach 48 Stunden Se-Supplementation nur unter normoxischen Bedingungen (Statistik: Students T-test $p \leq 0,001$ ***).

Der GPX-Aktivitätsassay mit tert-Butyl Hydroperoxid reflektiert die Aktivität von drei Selenoproteinen, GPX1, GPX2 und GPX3. Hypoxie reduzierte die Aktivität dieser drei Peroxidasen, jedoch wurde die GPX1 Protein Expression unter hypoxischen Bedingungen stark gehemmt, so dass der beobachtete Anstieg der Gesamtaktivität vermutlich das Resultat der Induktion der anderen beiden Peroxidasen sein musste. Die mRNA Expressionen der *GPX 1*, *2* und *3* und der in der GSH Wiederverwertung beteiligten Glutathion Reduktase (GSR) wurden nach 72 Stunden unter Hypoxie und Normoxie mit und ohne Se auf mRNA Ebene quantifiziert (Abbildung 12).

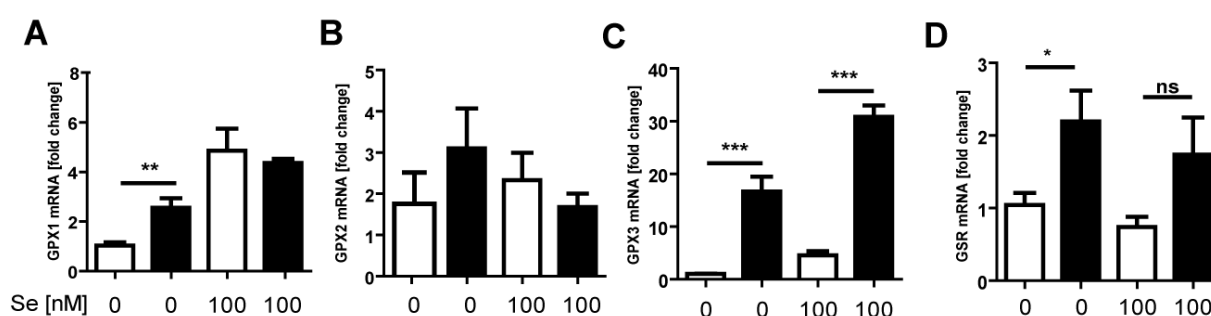


Abbildung 12: Differenzielle mRNA Regulation von Glutathion Peroxidasen und Reduktase während der Hypoxie. (A-D) mRNA Expression wurde für *GPX1*, *GPX2*, *GPX3* und *Glutathion Reduktase (GSR)* mittels RT-PCR quantifiziert (n=4). 18S rRNA diente der Normalisierung bei 72 Stunden Hypoxie (schwarze Balken) und Normoxie (weiße Balken) (Statistik: Students T-test ns=nicht signifikant; $p \leq 0,05$ * ; $p \leq 0,01$ ** und $p \leq 0,001$ ***).

Auf Transkript-Ebene wurde *GPX1* unter Se-armen Bedingungen (0 nM) signifikant hochreguliert; dies könnte einen kompensatorischen Mechanismus darstellen. *GPX2* wurde weder durch Se noch durch Hypoxie reguliert. Wohingegen die sekretierte *GPX3* als HIF Zielgen durch Hypoxie stark induziert wurde (Bierl et al. 2004). Se-Supplementation zeigte hier einen additiven Effekt sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie. *GPX3* könnte als zweites

sekretiertes Selenoprotein den Körper mit Se versorgen. Die GPX3 Aktivität konnte nicht im Medium bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Das an der Wiederaufbereitung von Glutathion beteiligte Enzyme Glutathion Reduktase war ebenfalls auf mRNA Ebene durch Hypoxie hochreguliert. Dieser Effekt war durch Se-Supplementation leicht gehemmt. Somit war die in Abbildung 10 beobachtetet verbliebene GPX-Aktivität wahrscheinlich durch das Isoenzym GPX3 hervorgerufen. GPX6 war in HepG2 Zellen nicht exprimiert. Das essentielle Isoenzym GPX4 kann als einzige GPX Lipidradikale neutralisieren und schützt somit die Integrität der Zellmembran (Seiler et al. 2008). HepG2 Zellen wurden 72 Stunden unter hypoxischen Bedingungen kultiviert und die GPX4 Aktivität sowie mRNA und Protein Expression quantifiziert (Abbildung 13).

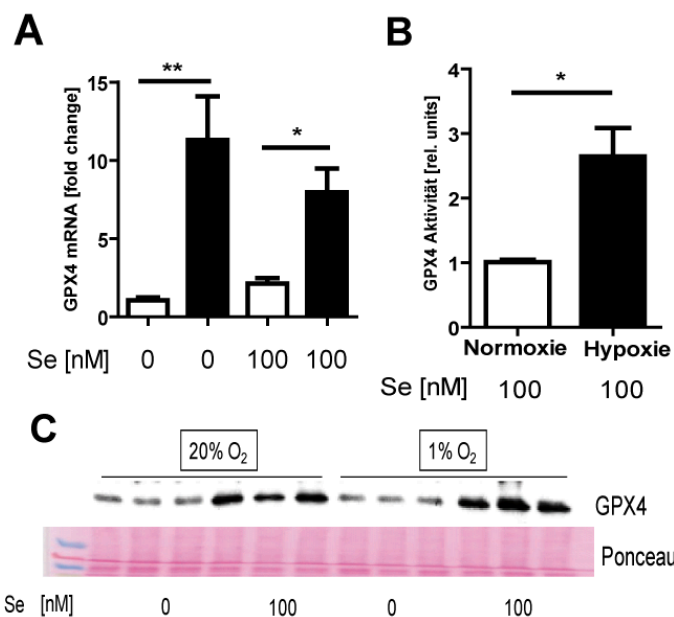


Abbildung 13. GPX4 wird durch Hypoxie induziert. (A). Nach 72 Stunden Hypoxie (schwarze Balken) und Normoxie (weiße Balken) wurden die GPX4 mRNA Transkripte mittels RT-PCR quantifiziert 18S rRNA diente der Normalisierung (n=4). (B) GPX4 Aktivität wurde mit dem Substrat Cumen Hydroperoxid quantifiziert (n=4). (C) Western Blot Analysen der GPX4 Expression in der Membranfraktion. Ponceau Rot Färbung zeigt gleiche Mengen in der Proteinbeladung (Statistik: Students T-test $p \leq 0,05^*$ und $p \leq 0,01^{**}$).

Im Gegensatz zu den anderen intrazellulären GPX wurde GPX4 sowohl auf mRNA als auch auf Aktivitätsebene unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert. Die Protein Expression war unter Hypoxie bei Se-Supplementation leicht erhöht, wobei unter nicht-supplementierten Bedingungen die Expression leicht absank.

Zusammenfassend zeigten die GPX eine differentielle Regulation; *GPX1* und *2* sind durch Hypoxie herunter bzw. nicht reguliert, im Gegensatz dazu werden *GPX3* und *4* auf mRNA Ebene stark hochreguliert. Die intrazelluläre Gesamt-GPX-Aktivität sank unter Hypoxie, wohingegen die Aktivität der membranständigen GPX4 unter Hypoxie zunahm.

3.1.6 Regulation anderer Selenoprotein Transkripte durch Hypoxie

Es stellte sich die Frage, ob andere Selenoprotein Transkripte in ähnlich starker Weise wie die Glutathion Peroxidasen durch Hypoxie reguliert werden. Die mRNA Transkripte wurden nach 72 Stunden Hypoxie mit und ohne Se-Supplementation analysiert (Abbildung 14).

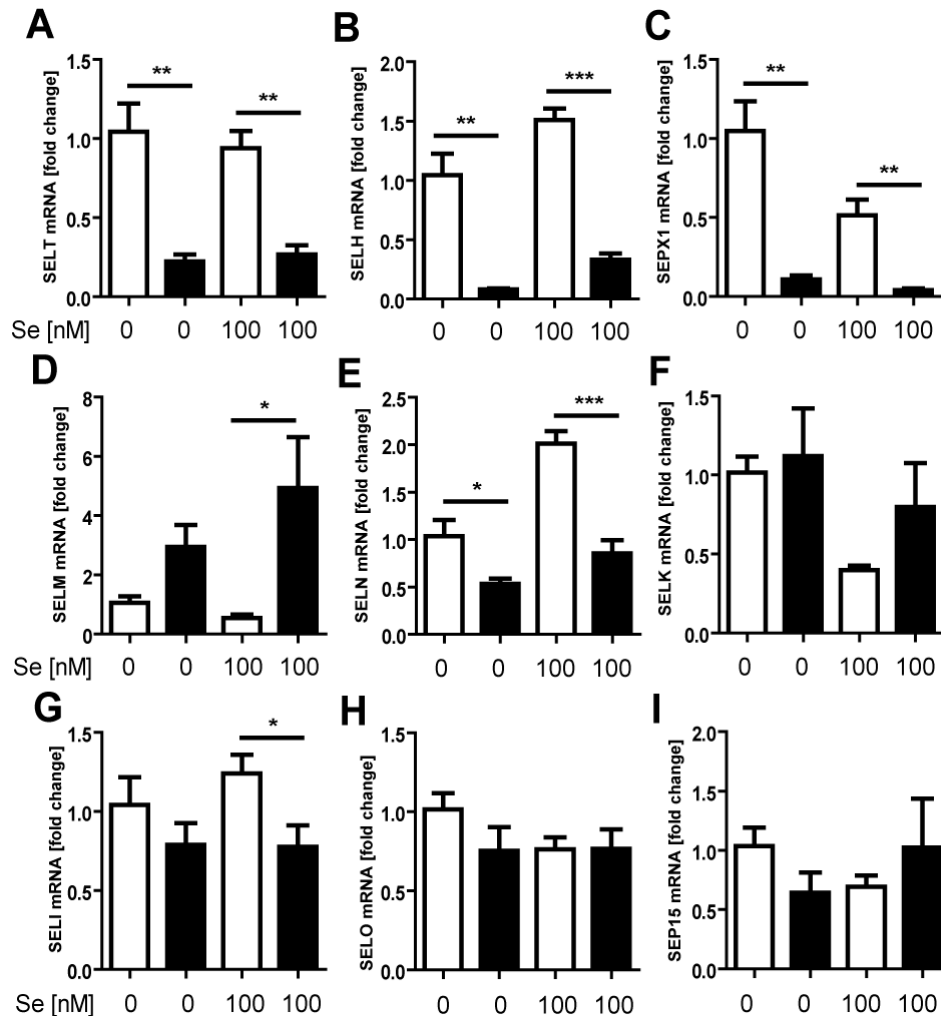


Abbildung 14: Regulation von Selenoproteinen durch Sauerstoff und Se

(A-I) mRNA Transkriptbestimmung von *SELT*, *SELH*, *SEPX1*, *SELM*, *SELN*, *SELK*, *SELI*, *SELO* und *SEP15* nach 72 Stunden Normoxie (weiße Balken) und Hypoxie (schwarze Balken). Normalisiert wurde auf 18S rRNA (n=4). *SELT*, *SELH*, *SEPX1*, *SELN* und *SELI* zeigte eine verminderte Expression unter Hypoxie, wohingegen *SELM* unter Hypoxie mit Se-Supplementation hochreguliert war (Statistik: Students T-test $p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$ und $p \leq 0,001^{***}$).

Bei der Transkriptanalyse anderer zum Teil noch nicht erforschter Selenoproteine zeigt sich auch bei diesen eine differentielle Regulation durch Hypoxie und Se. So folgten *Selenoprotein T (SELT)*, *Selenoprotein H (SELH)*, *Selenoprotein N (SELN)* und *Selenoprotein I (SELI)* dem vorher beobachteten Trend der verminderten Expression durch Hypoxie. *Selenoprotein M (SELM)*, welches eine vermutete Funktion im Energiestoffwechsel hat (Pitts et al. 2013), zeigte hingegen eine erhöhte Expression durch Hypoxie.

3.1.7 Regulation der SECIS abhängigen Sec Insertion durch Hypoxie

Besonders die Ergebnisse der GPX und SELS deuteten, neben einer transkriptionellen auch auf eine translationale Regulation während der Hypoxie hin. Ein möglicher präferentieller Sec Einbau könnte durch das in der 3'UTR befindliche SECIS Element vermittelt sein (Latreche et al. 2012). HepG2 Zellen wurden mit einem pBPLuga Konstrukt, welches einen Reporter (i.e. Firefly Luciferase) nur bei Überlesen des UGA Stopp-Codons exprimiert, transfiziert und anschließend für 24 Stunden mit aufsteigenden Se Konzentrationen bei Normoxie und Hypoxie kultiviert. Die Überleseeffizienz wurde zwischen Konstrukten, die zum einen das durch Hypoxie vermindert exprimierte SePP SECIS Element tragen, und zum anderen das der hochregulierten GPX4 enthalten, verglichen (Abbildung 15).

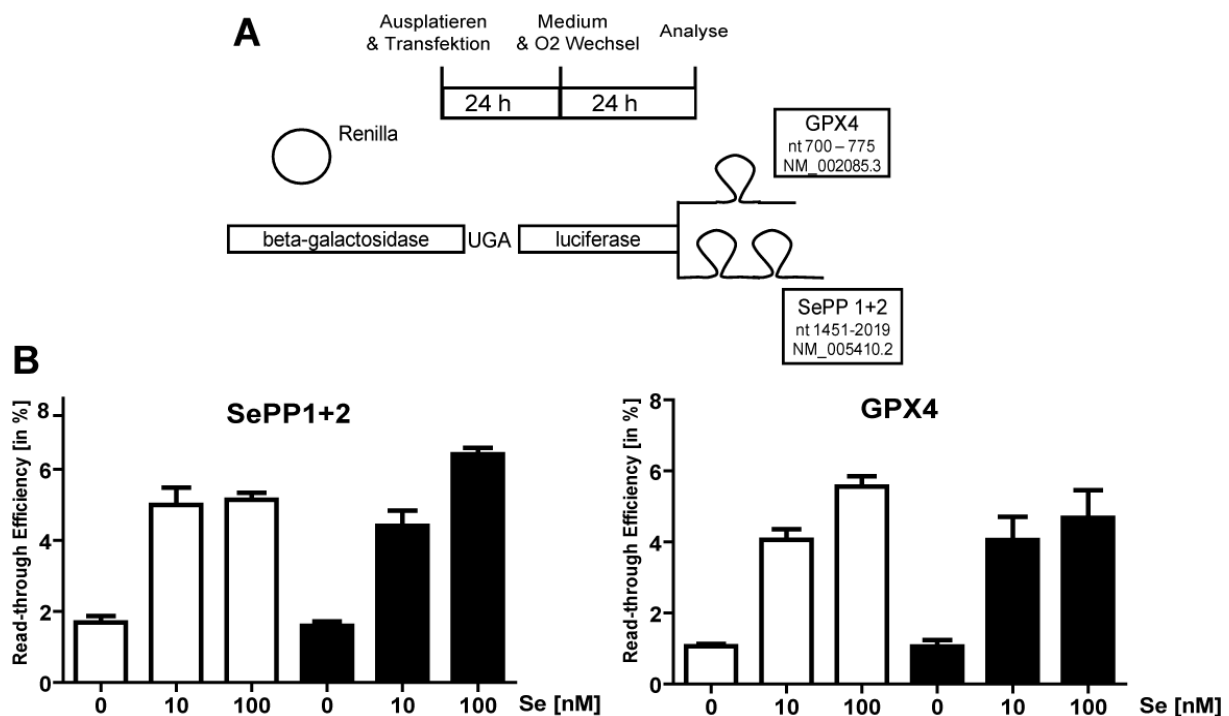


Abbildung 15: Die Hypoxie Effekte sind nicht durch SECIS abhängige Sec Insertion vermittelt. (A) Übersicht über den Versuchsaufbau und die verwendeten GPX4 und SePP1+2 pBPLuga Plasmide. Ein konstitutiv aktives Renilla-Plasmid wurde als Normalisierungskontrolle co-transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde das Medium entfernt und mit selenhaltigem Medium ausgetauscht. In transfizierten Zellen wurden nach 24 Stunden Normoxie bzw. Hypoxie die Luciferase und Renilla Aktivität analysiert. (B) SECIS vermittelte Luciferase Aktivität, quantifiziert als Überlese Effizienz, stieg sowohl bei Normoxie (weiße Balken) als auch Hypoxie (schwarze Balken) in beiden SePP1+2 und GPX4 pBPLuga Konstrukten an.

Beide SECIS Elemente vermittelten den Einbau von Sec, angezeigt durch die gesteigerte Luciferase Aktivität, sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie. Die Überleseeffizienz steigt bei Zusatz von 10 nM Se an. Diese Induktion ließ sich durch eine höhere Selenkonzentration nur für GPX4 bei Normoxie steigern. Bei dem SePP1+2 SECIS Element-vermittelten Sec Einbau stagnierte die Effizienz bei 5%. Bei Hypoxie wurde die Effizienz bei hohen Se

Konzentration von 100 nM auf 7% gesteigert. Das GPX4 SECIS Element blieb hier bei 5% Effizienz. Zusammenfassend ließ sich durch den SECIS vermittelten Sec Einbau nicht die zuvor beschriebene differentielle Selenoprotein Expression durch Hypoxie erklären.

3.1.8 Regulation von SePP und GPX4 durch HIF

Die klassische zelluläre Hypoxieantwort wird durch HIF Transkriptionsfaktoren vermittelt, die sauerstoffabhängig stabilisiert oder degradiert werden (Semenza 2007). Als Erkennungsmerkmal für die Degradation dient eine Hydroxilierung der Proline an Aminosäure Positionen 402 und 564 bei HIF1 α und der Proline 405 und 531 bei HIF2 α . Durch Austausch dieser Proline zu Alaninen ist eine Hydroxilierung unmöglich und die Transkriptionsfaktoren werden auch bei Normoxie stabil exprimiert. Diese Genvarianten wurden in einem transienten Überexpressions-Experiment eingesetzt. Die funktionelle Aktivität wurde mit einem HRE-Luciferase Konstrukt überprüft, sowie der Einfluss der überexprimierten Varianten auf die Selenoprotein P Expression im Medium und die GPX4 Aktivität von HepG2 Zellen quantifiziert (Abbildung 16).

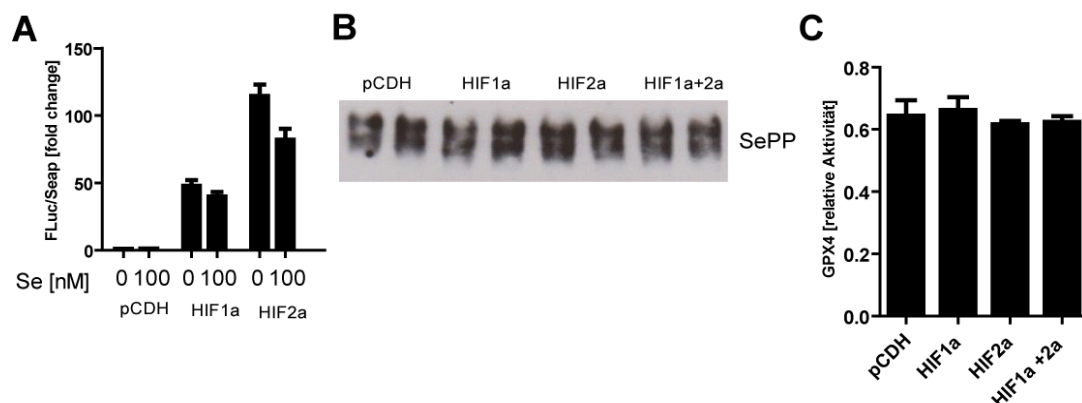


Abbildung 16: Konstitutiv aktives HIF 1 und 2 haben keinen Einfluss auf SePP und GPX4

(A) Konstitutiv aktives HIF1 α und HIF2 α (HIF1a und HIF2a) sowie ein Leerplasmid (pCDH) wurden mit einem HRE-Luciferase Reporterplasmid mit und ohne Se in HepG2 Zellen co-transfiziert und zeigten jeweils eine 50 bzw. 100 fache Induktion (n= 7). Ein SEAP-Plasmid diente der Transfektionskontrolle und Normalisierung. (B) SePP Konzentration wurde mittels Western Blot Analyse 72 Stunden nach Transfektion und 48 Stunden nach Mediumwechsel (100 nM Se) quantifiziert. (C) Intrazelluläre GPX4 Aktivität zeigte keinen Unterschied nach Transfektion mit konstitutiven HIFs.

Die Überexpression von konstitutiv aktivem HIF1 α und HIF2 α führte zu einer starken Luciferase Induktion des HRE-Reporterplamids. Es wurde besonders die HIF2 Stimulation des Plasmides durch die Gabe von Se (100 nM) um ca. 30% gehemmt. Überexpression von konstitutiv aktivem HIF1 α und 2 α alleine oder in Kombination hatten keinen Einfluss auf die SePP Expression oder GPX4 Aktivität.

Alle HIF Transkriptionsfaktoren brauchen HIF1 β (auch "ARNT" genannt), um an das HRE in der DNA zu binden (Benita et al. 2009). Zur Überprüfung, ob HIF Transkriptionsfaktoren keinen Einfluss auf SePP und GPX4 hatten, wurden HepG2 Zellen mit einem dominant negativen HIF1 β (" Δ ARNT" genannt, da hier die DNA bindende Region deletiert wurde) transfiziert und die HRE-Luciferase Aktivität bei Hypoxie und SePP Expression bei Normoxie und Hypoxie analysiert (Abbildung 17).

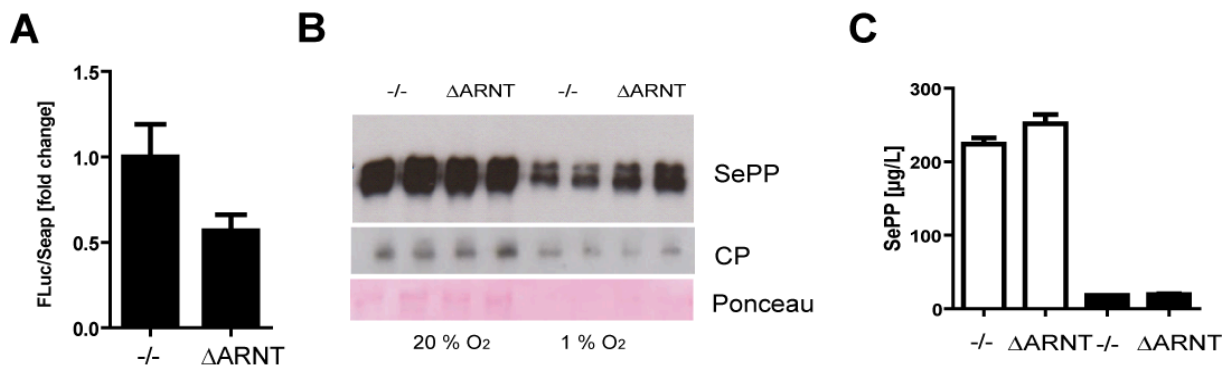


Abbildung 17: Dominant negatives HIF1 β hat keinen Einfluss auf die SePP Expression.

(A) Kotransfektion von HRE-Luciferase Reporterplasmid, SEAP Normalisierungsplasmid und Δ ARNT Plasmid senkte die Luciferase Aktivität 48 Stunden nach Transfektion und 24 Stunden in Hypoxie (schwarze Balken) im Vergleich zur Kotransfektion mit einem Leerplasmid (-/-) in HepG2 Zellen. (B) SePP Konzentrationen im Medium von HepG2 Zellen nach Transfektion von Leerplasmid (-/-) oder Δ ARNT Plasmid 72 Stunden nach Transfektion und 48 Stunden nach Mediumwechsel mit selenhaltigem Medium (100 nM) und Hypoxie-Induktion wurden mittels Western Blot quantifiziert. Der ebenfalls sekretierte Kupfer Transporter Ceruloplasmin (CP) und die gesamte Proteinfärbung mit Ponceau Rot dienten als Ladekontrolle. (C) SePP Quantifizierung mit einem SePP ELISA zeigte keinen Einfluss von Δ ARNT auf SePP (n=3).

Eine Kotransfektion mit dem Δ ARNT Plasmid verminderte die HRE-Luciferase Aktivität um fast 40% während der Hypoxie. Jedoch konnte die Δ ARNT Transfektion nicht die SePP Expression wiederherstellen.

3.1.9 Einfluss von hepatischem Hif knock-out *in-vivo*

Selenoprotein P ist der zentrale Se-Transporter und wird hauptsächlich in der Leber produziert. Dieser bestimmt maßgeblich den Selenspiegel im Serum (Schomburg et al. 2003). Mit Hilfe eines Mausmodells, in dem leberspezifisch HIF1 α ausgeschaltet ist, konnte die Frage nach der *in-vivo* Regulation von Selenoproteinen, exemplarisch abgeleitet durch den Selenspiegel im Serum, durch HIF1 α untersucht werden. Das gefloxt HIF1 α Allel wurde durch die Cre-Rekombinase, welche unter der Kontrolle des nur in der Leber exprimierten Albumin stand, deletiert. Böcke trugen ein Protoonkogen auf dem Y-Chromosom und entwickelten ein Hepatokarzinom (Daskalow et al. 2010). Die gemessenen Spurenelemente zeigten einen starken Unterschied zwischen Gesunden Weibchen und tumorkranken Männchen (Abbildung 18).

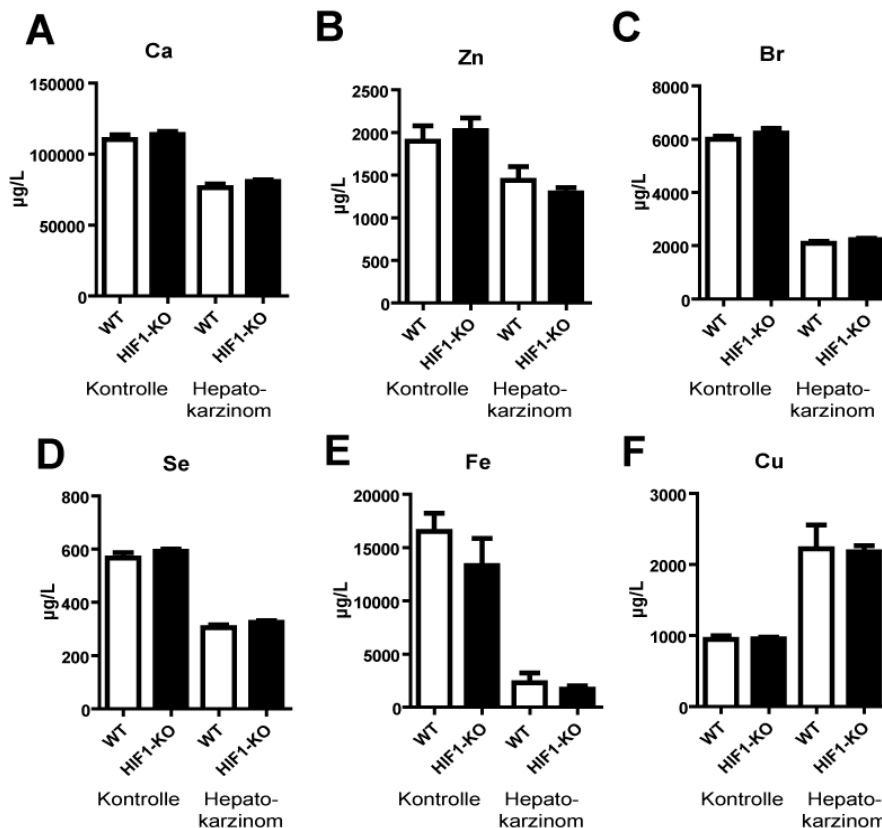


Abbildung 18: Spurenelementspiegel in einem Hepatokarzinom-Mausmodel mit leberspezifischem HIF1 α knock-out. (A-F) Die Spurenelemente Calcium (Ca), Zink (Zn), Brom (Br), Selen (Se), Eisen (Fe) und Kupfer (Cu) wurden mittels Totalreflektions-Röntgenfluoreszenzanalyse in Wild-type (WT) und HIF1 knock-out (HIF1-KO) Weibchen (n=3 und n=4) sowie WT und HIF1-KO tumortragenden Männchen (n=5) bestimmt.

Es zeigte sich weder in Weibchen noch in erkrankten Männchen ein Effekt der leberspezifischen HIF1 α Deletion auf eines der untersuchten Spurenelemente. Sehr wohl hatte der massive Tumorbefall der Leber eine starke Auswirkung auf die Spurenelemente. So sanken die Spiegel von allen Elementen, bis auf Kupfer, da dieses durch pro-inflammatorische Zytokine (i.e. Interleukin-6) reguliert wird (Conley et al. 2005). Totale Eisen (Fe) Werte waren schwer zu interpretieren, da diese stark abhängig vom Grad der Hämolyse sind. Das Platzen von Erythrozyten bei der Blutentnahme lässt die Eisenwerte stark in die Höhe schnellen, wie in Abbildung 18 E zu beobachten war.

3.1.10 Regulation der Selenoproteinbiosynthesemaschinerie durch Hypoxie

Eine Vielzahl von Enzymen ist an der Sec-Biosynthese und dessen Einbau während der Translation von Selenoproteinen beteiligt (Bellinger et al. 2009). Die induzierten Akut-Phase-Reaktion in der Maus, was auch ein Model für induzierte hepatische Hypoxie *in-vivo* ist, zeichnet sich durch eine Herunterregulation von verschiedenen Schlüsselenzyme der

Biosynthesemaschinerie aus (Renko et al. 2009, James et al. 2002). Diese Enzyme wurden auf Transkriptebene nach 72 Stunden Hypoxie in HepG2 Zellen untersucht (Abbildung 19).

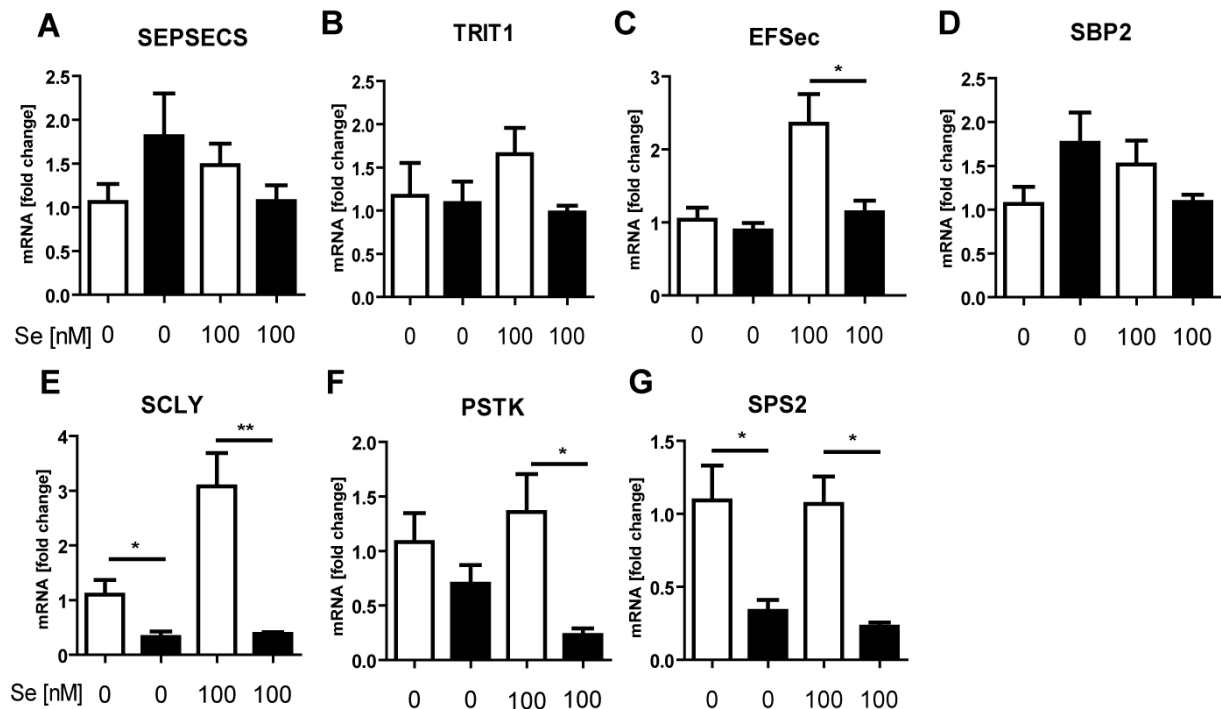


Abbildung 19: Hypoxie reguliert die Selenoprotein Biosynthesemaschinerie. (A-G) mRNA Quantifizierung von *SEPSECS*, *TRIT1*, *EFSec*, *SBP2*, *SCLY*, *PSTK* und *SPS2* zeigte eine Herunterregulation nach 72 Stunden Hypoxie (schwarze Balken) von *EFSec*, *SCLY*, *PSTK* und *SEPHS2* im Vergleich zu Normoxie (weiße Balken). 18S rRNA diente als Housekeeper der Normalisierung (n=4) (Statistik: Students T-test $p \leq 0,05^*$ und $p \leq 0,01^{**}$).

Es zeigte sich eine Regulation auf den Ebenen der Sec-Biosynthese, des Einbaus und Recyclings. Die beiden phosphorylierenden Enzyme PSTK und SEPHS2 wurden durch Hypoxie herunterreguliert, PSTK stärker bei Se-Supplementation und SEPHS2 signifikant bei Hypoxie unabhängig vom Selenstatus. Die selenabhängige Induktion des UGA Rekodierungsfaktors EFSec wurde durch Hypoxie gehemmt. Auch die Expression des Sec Recycling Enzymes SCLY wurde generell durch Hypoxie gehemmt und keine selenspezifische Induktion war zu beobachten.

3.1.11 Regulation der Promotoren von Selenoproteinen durch Hypoxie

Die Expressionsdaten deuteten auf eine Regulation durch Se und Hypoxie hin. Um mögliche Transkriptionsfaktoren oder andere regulatorische Elemente zu identifizieren, wurden die Kernpromotoren (ca. 1kb 5' vom Transkriptionsstart) in ein Luciferase Reporter-gen Konstrukt kloniert. Diese wurden in HepG2 Zellen transfiziert und 24 Stunden unter Hypoxie kultiviert (Abbildung 20).

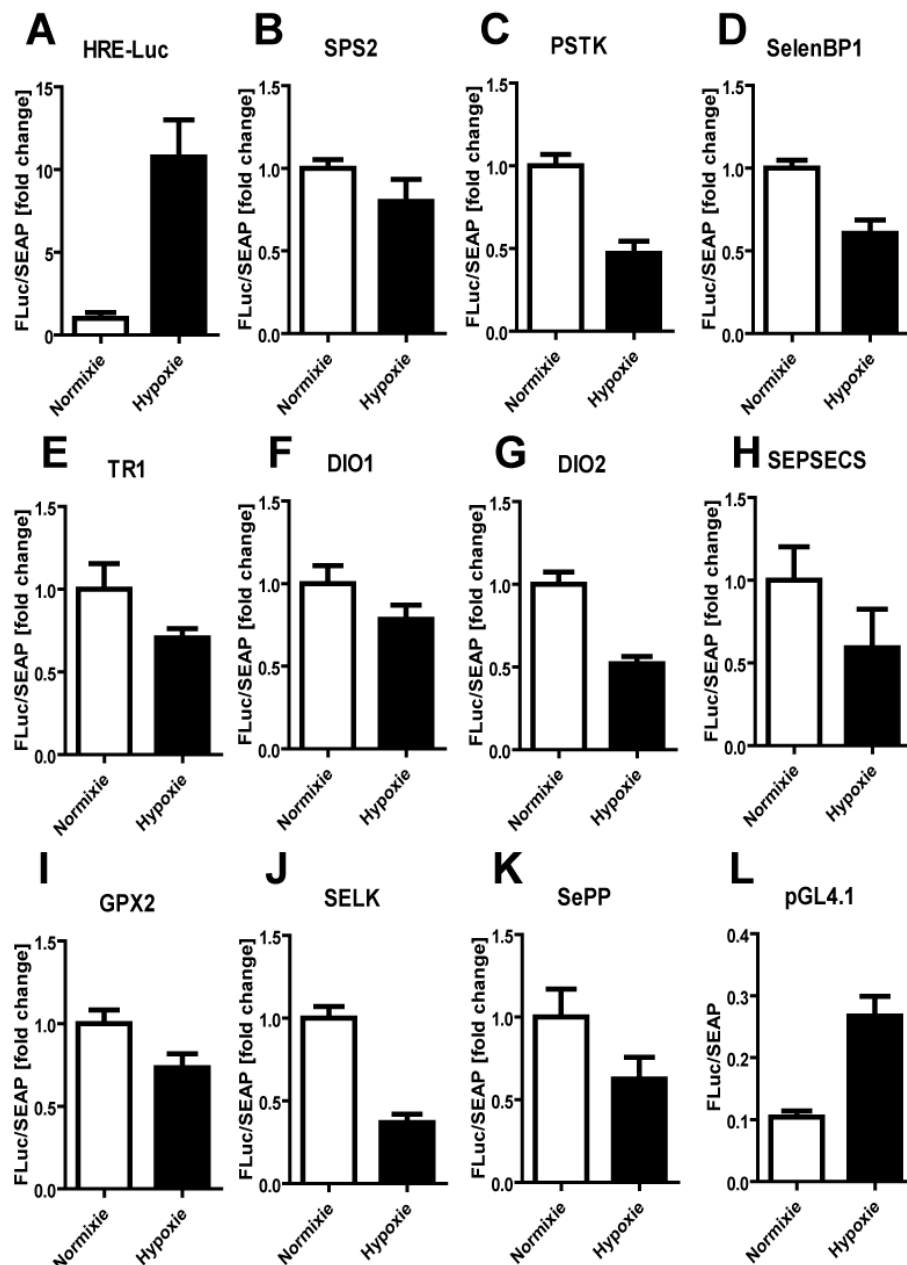


Abbildung 20: Regulation von Selenoproteingenpromotoren und des Leervektors durch Hypoxie. (A) Die Luciferase Aktivität des HRE-Luc Hypoxiereporters stieg stark unter hypoxischen Bedingung (schwarze Balken) im Vergleich zur 24 stündigen Kultivierung unter normoxischen Bedingungen (weiße Balken) an. SEAP Aktivität im Medium diente der Normalisierung (n=7). (B-K) Normalisierte Aktivitäten der Kernpromotoren von SEP2, PSTK, SelenBP1, TR1, DIO1, DIO2, SEPSECS, GPX2, SELK und SePP zeigen alle eine niedrigere Aktivität unter Hypoxie. (L) Gesteigerte Aktivität des pGL4.1 Luciferase-Vektors unter Hypoxie.

Unter Hypoxie zeigte der HRE-Luciferase Reporter einen ca. 10-fachen Anstieg, jedoch war die Luciferase Aktivität bei allen Selenoproteingenpromotoren vermindert. Dies ließ sich durch die Regulation des Leerplasmides pGL4.1 durch Hypoxie erklären, da in der Aktivitätsberechnung auf das Leerplasmid normiert wurde. Daher war keiner der hier untersuchten Kernpromotoren stark durch Hypoxie reguliert und eignete sich damit auch nicht als Startpunkt zur Ergründung der molekularen Regulation.

3.1.12 Regulation von SePP durch die Glutamin Konzentration im Medium

Wie wichtig die Zusammensetzung des Mediums für die SePP Expression ist, zeigte die Titration von Glutamin bei HepG2 Zellen unter Normoxie und Hypoxie (Abbildung 21).

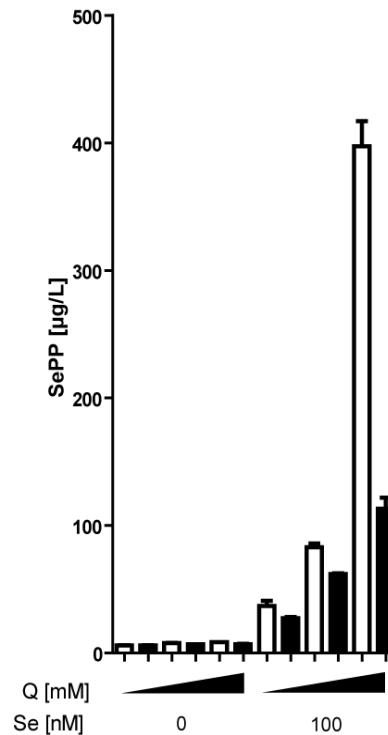


Abbildung 21: Effekt von Glutamin und Hypoxie auf die Selenoprotein P Expression. Selenoprotein P Konzentrationen wurden in einem SePP-ELISA mit ansteigenden Glutamin (Q) Konzentrationen (0; 0,2; 2 mg/ml) in HepG2 Zellen bei 72 Stunden Normoxie (weiße Balken) und Hypoxie (schwarze Balken) mit und ohne Se quantifiziert (n=2).

SePP war weder bei Normoxie noch Hypoxie ohne Se (0 nM) detektierbar. Nach Se-Supplementation (100 nM) stieg die SePP Expression im Medium kontinuierlich mit der Glutaminkonzentration bei Normoxie an. Bei Hypoxie war dieser Effekt immer noch erkennbar, aber viel moderater. Die Glutaminkonzentration im Medium sollte beim Betrachten von *in-vitro* Ergebnissen von SePP zwischen verschiedenen Laboren in Betracht gezogen werden.

3.2 Regulation von Selenoproteinen und der Selenoproteinbiosynthese in humanen mesenchymalen Stammzellen

3.2.1 Hypoxie Nachweis *in-vitro*

Hypoxie hatte einen starken Einfluss auf die Expression von Selenoproteinen in HepG2 Zellen. Mesenchymale Stammzellen (MSC) verfügen über das Potential, sich in verschiedene Gewebe zu differenzieren. In ihrer physiologischen Umgebung herrschen oft hypoxische Bedingungen (Bianco et al. 2013, Haque et al. 2013). Die mRNA Expression von humanen MSC Zellen von einem männlichen und einem weiblichen Spender wurden in Doppelbestimmungen unter Se-armen (0 nM) und Se-reichen (100 nM) Bedingungen während normoxischen (20% O₂) und hypoxischen Bedingungen (1% O₂) nach 72 Stunden quantifiziert (Abbildung 22).

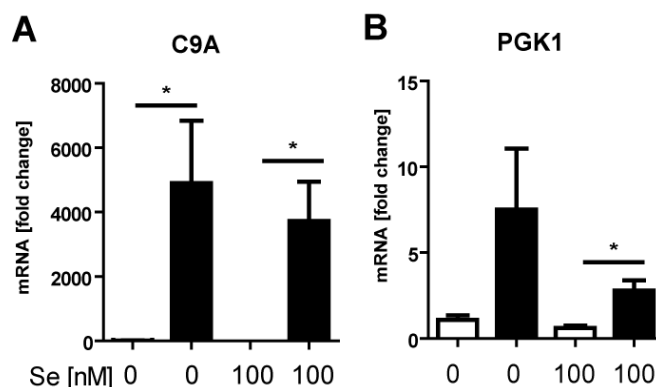


Abbildung 22. Hypoxie induziert C9A und PGK1 in humanen MSC. (A und B) RT-PCR Expressionsanalysen der Hypoxiemarker C9A und PGK1 zeigten eine Induktion bei 72 stündiger Kultivierung unter Hypoxie (schwarze Balken) im Vergleich zu Normoxie (weiße Balken). 18S rRNA diente der Normalisierung (n=4). (Statistik: Students T-test $p \leq 0,05^*$).

Nach 72 Stunden Hypoxie wurden die beiden Hypoxiemarker *C9A* und *PGK1* stark induziert. Da es sich um primäre Zellen von genetisch unterschiedlichen Spendern handelt, zeigte sich eine größere Standardabweichung in den Expressionsspiegeln als in Experimenten mit stabilen Zelllinien. In dem gewählten MSC Zellkulturmodell ließ sich die Hypoxieantwort sehr gut nachbilden.

3.2.2 Regulation von Selenoproteinen durch Hypoxie in MSC

In humanen Leberzellen waren Selenoprotein mRNAs durch Hypoxie stark reguliert (Abbildungen 8-14). Die Expression einer Reihe von Selenoproteinen wurde in humanen MSC mittels RT-PCR nach Hypoxie vergleichend von Se-armen (0 nM) und Se-reichen (100 nM) Bedingungen quantifiziert (Abbildung 23).

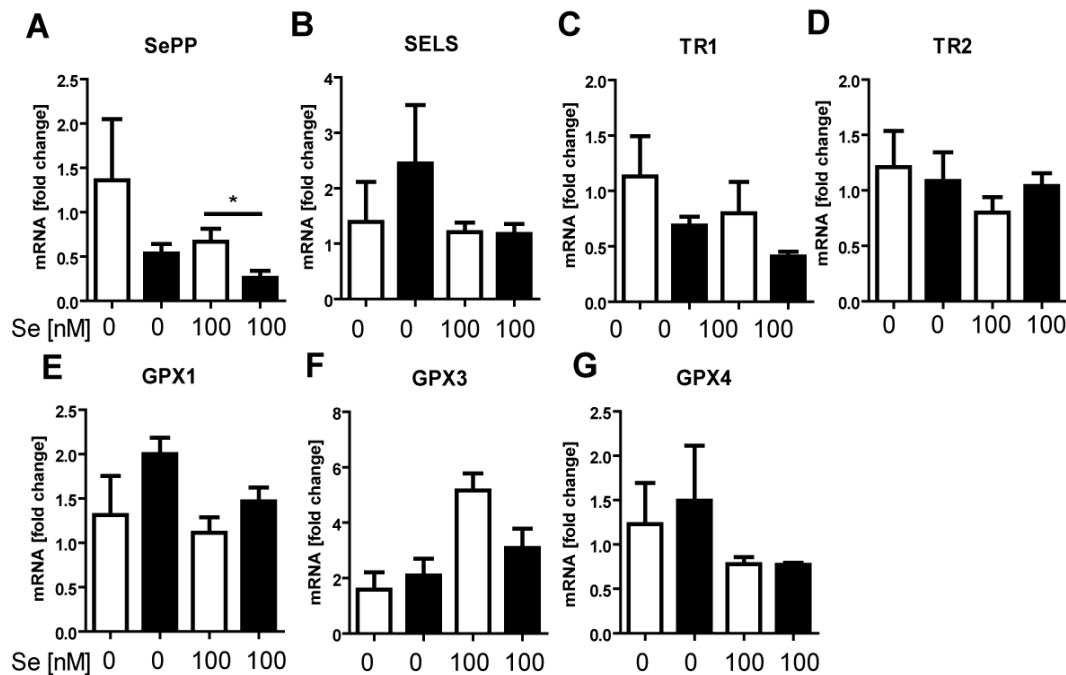


Abbildung 23: Selenoprotein-Transkripte in humanen MSC nach Hypoxie. (A-G) RT-PCR Quantifizierung von Selenoprotein-Transkripten *SePP*, *SELS*, *TR1*, *TR2*, *GPX1*, *GPX3* und *GPX4* nach 72 Stunden Hypoxie (schwarze Balken) und Normoxie (weiße Balken). 18s rRNA diente der Normalisierung (n=4). (Statistik: Students T-test $p \leq 0,05^*$).

Auf Transkriptebene war in humanen MSC nur *SePP* signifikant differentiell durch Hypoxie bei Se-Supplementation herunterreguliert. *GPX1* schien einer leichten hypoxiebedingten Heraufregulation zu unterliegen. Die *GPX3* Transkripte hingegen sind durch Se-Supplementation tendenziell hochreguliert, wohingegen *GPX4* Transkripte durch Supplementation nicht reguliert werden. Auch *TR1* und *TR2* waren nicht reguliert.

3.2.3 Regulation von SePP-Rezeptoren durch Hypoxie

SePP ist der zentrale Transporter für Se in das Gewebe, aufgenommen wird SePP gewebespezifisch durch LRP Rezeptoren (Kurokawa et al. 2014). Die Expression der SePP-Rezeptoren wurde in humanen MSC nach Se-Supplementation bei Normoxie und Hypoxie für 72 Stunden quantifiziert (Abbildung 24).

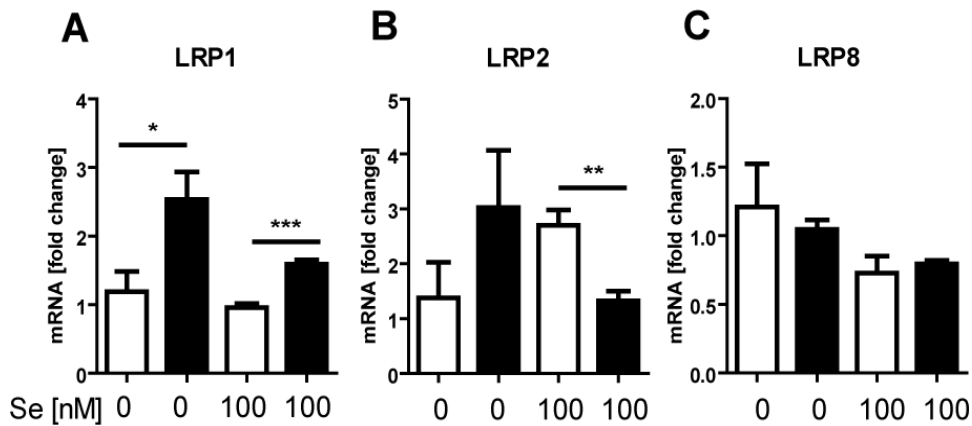


Abbildung 24. Differentielle Regulation von SePP Rezeptoren in humanen MSC. (A-C) RT-PCR Quantifizierung von LRP1, LRP2 und LRP8 in humanen MSC bei Normoxie (weiße Balken) und Hypoxie (schwarze Balken). (Statistik: Students T-test $p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$ und $p \leq 0,001^{***}$).

LRP8 wurde weder durch Hypoxie noch durch die Se-Supplementation reguliert. LRP1 hingegen stieg signifikant unter hypoxischen Bedingung in humanen MSC an, während LRP2 bei Se-Supplementation und Hypoxie eine verminderte Expression aufwies.

3.2.4 Regulation von Selenoprotein-Biosyntheseenzymen durch Hypoxie

In humanen HepG2 Zellen war die Regulation von Schlüsselenzymen der Selenoproteinbiosynthese der Mechanismus hinter der differentiellen Expression von Selenoproteinen bei Hypoxie (Abbildung 19). Humane MSC wurden mit und ohne Se bei Normoxie und Hypoxie für 72 Stunden inkubiert und die mRNA Transkripte der Biosyntheseenzyme quantifiziert (Abbildung 25).

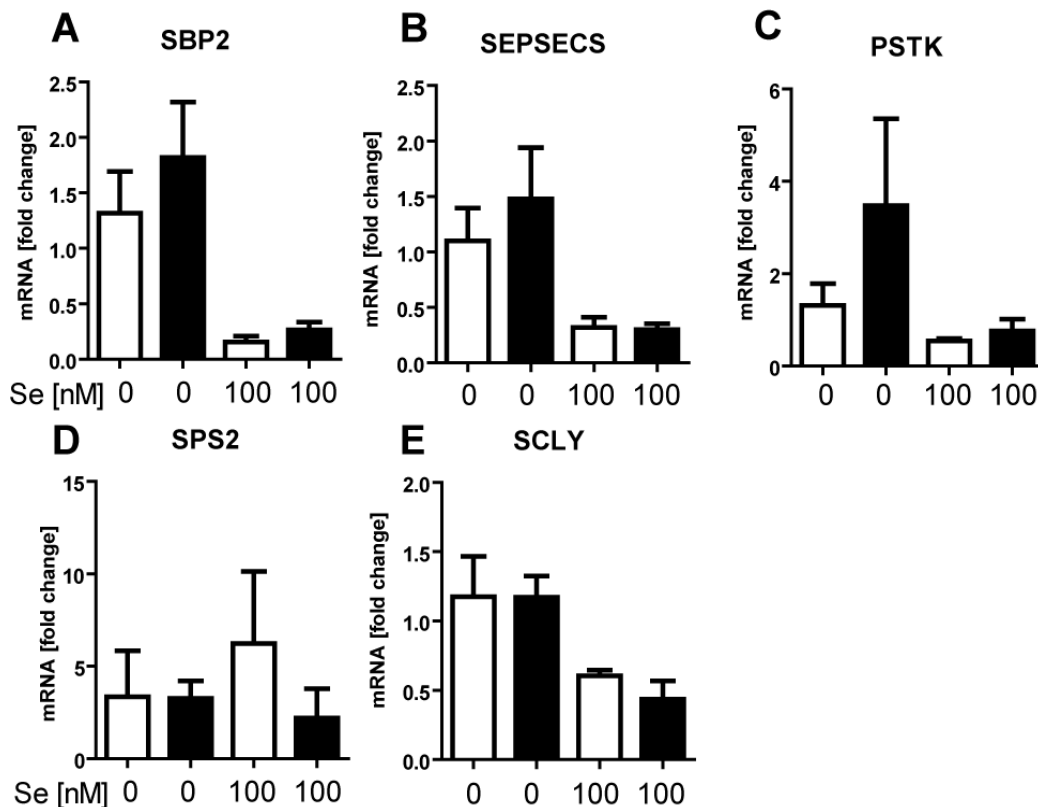


Abbildung 25: Regulation der Selenoprotein Biosynthesemaschinerie in humanen MSC durch Hypoxie. (A-E) mRNA Quantifizierung von *SBP2*, *SEPSECS*, *PSTK*, *SPS2* und *SCLY* mittels RT-PCR in humanen MSC unter Normoxie (weiße Balken) und Hypoxie (schwarze Balken) mit und ohne Se (0 und 100 nM). 18S rRNA diente der Normalisierung (alle Gruppen n=4 bis auf *SBP2*, *PSTK*, *SCLY* bei Hypoxie und *SEPSECS* bei 100 nM Se und Hypoxie, hier jeweils n=3)

Bis auf *SPS2* wurden alle anderen Enzyme der Biosynthese nicht durch Hypoxie sondern lediglich durch Se reguliert. *SBP2*, essentiell für die Expression aller Selenoproteine, wurde stark vermindert bei Supplementation exprimiert. Ebenfalls unabhängig von der Sauerstoffversorgung waren *SEPSECS*, *PSTK* und *SCLY* durch Se herunterreguliert.

3.2.5 Regulation von intrazellulären selenbindenden Proteinen

Se wird hauptsächlich in Form von Selenoproteinen intrazellulär gespeichert, dennoch sind zwei selenbindende Proteine (i.e. SeBP1 und FABP1) beschrieben (Banerjee and Sani 1982, Bansal et al. 1989). Die Expression dieser beiden Transkripte wurde in humanen MSC nach 72 Stunden Normoxie oder Hypoxie mit und ohne Se-Supplementation untersucht (Abbildung 26).

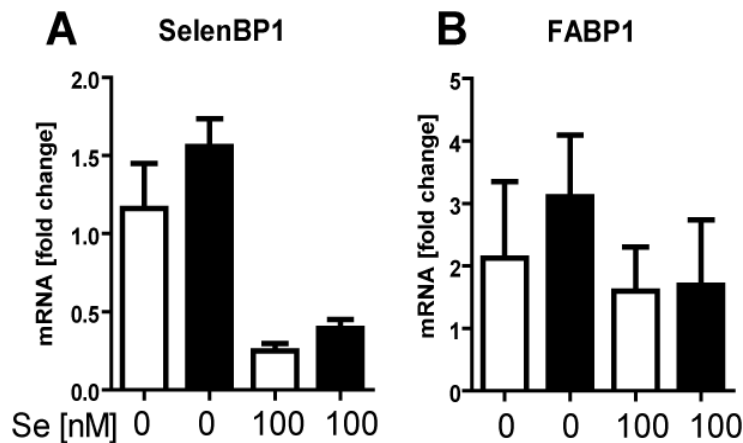


Abbildung 26: SelenBP1 und FABP1 Expression in humanen MSC bei Hypoxie. (A und B) Transkriptanalyse mittels RT-PCR in humanen MSC bei Normoxie (weiße Balken) und Hypoxie (schwarze Balken) mit und ohne Se. 18S rRNA diente der Normalisierung (n=4).

Ähnlich wie bei den Enzymen der Selenoproteinbiosynthese war das Selenbindende Protein *SelenBP1* durch Se-Supplementation unabhängig von Hypoxie herunterreguliert. Sauerstoffmangel hatte auf Transkriptebene einen leicht stimulierenden Effekt. Die *FABP1* Expression war unverändert.

Zusammenfassend verhielt sich die Hypoxieantwort in humanen MSC divergent zu HepG2 Leberzellen. In MSC hatte die verminderte Sauerstoffzufuhr keinen massiven Effekt auf die Selenoprotein-Gene und die Expression der Komponenten der Biosynthesemaschinerie. In diesen Zellen war die Genexpression jedoch durch Se selber gesteuert. So hatte das Spurenelement eine stark inhibierende Wirkung, besonders auf die Biosynthesemaschinerie. Ein solches Verhalten ist bisher in der Literatur in noch keinem Zellsystem beobachtet worden und auch der molekulare Mechanismus ist noch unbekannt.

3.3 Effekt von Polytrauma auf die Se-Spiegel im Menschen

In Kooperation mit Kollegen der LMU München wurde eine Se-Supplementationsstudie zu der Bedeutung von Se bei schwerem Trauma vermessen. Die Studie umfasste 33 Polytrauma Patienten, von denen sieben eine Se Supplementation erhielten. Die Se und SePP Spiegel wurden 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Aufnahme auf die Intensivstation quantifiziert. 22 der 33 Patienten überlebten die ersten 72 Stunden. Weder Se, SePP oder eine Supplementation zeigten eine signifikante Korrelation zum Überleben der Polytrauma-Patienten. Der Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (APACHE) II Score ist ein Wert, der die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten vorhersagt. Hierbei werden zu dem Alter auch das chronische Krankheitsbild und die akute Verfassung in den letzten 24 h des Patienten berechnet. Ein hoher Wert korreliert mit einem schlechten Ausgang (Knaus et al. 1985). Die Se-Spiegel

bei Aufnahme auf die Intensivstation wurden mit dem APACHE II Score korreliert. Hierbei zeigt sich eine negative Korrelation, d.h., hohe Se-Spiegel gingen einher mit einem guten, niedrigen APACHE II Score.

Der Horovitz-Index wird in der Intensivmedizin zur Beschreibung der Lungenfunktion genutzt. Der Index berechnet sich aus dem Quotienten des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks und dem Sauerstoffgehalt in der inhalierten Luft. Je höher der Wert desto besser die Lungenfunktion (Bein and Pfeifer 2007). In der von uns untersuchten Studie wurden die Se-Spiegel mit dem Horovitz-Index von den Kollegen aus München korreliert. Die Se-Spiegel bei Aufnahme auf die Intensivstation korrelierten positive mit der Lungenfunktion (Horovitz-Index) an den späteren Zeitpunkten 48h und 72h. Der hier gezeigte eindeutig positive Trend von hohen Se-Spiegeln mit der Lungenfunktion an späteren Zeitpunkten ist das erste Indiz von einem Zusammenhang zwischen Sauerstoff und Se-Spiegeln im Menschen.

3.4 Klinische Studie „Se und Schilddrüsenhormone bei Neugeborenen mit klinischer Sepsis“

Selenspiegel im Blut sinken rapide bei kritischen Erkrankungen wie Sepsis (Hollenbach et al. 2008). Der Einfluss einer konnatalen Infektion, also einer Infektion, die vor oder während der Geburt stattfindet, auf die Selenversorgung ist bisher noch nicht untersucht. Mit der Initiation der klinischen Studie „Spurenelemente und Schilddrüsenhormone bei Neugeborenen mit klinischer Sepsis“ sollte diese Wissenslücke geschlossen werden und die Hypothese, dass Neugeborene mit einer Infektion einen Selenmangel entwickeln, getestet werden. Dies stellte große Herausforderungen an das Studiendesign. Neonaten werden nur Kleinstmengen an Blut abgenommen, und eine extra für die Studie durchgeführte Abnahme war ethisch nicht zu rechtfertigen. Daher mussten alle Analysen aus Restseren durchgeführt werden. Mit der TXRF Technologie und dem SePP ELISA standen zwei Techniken zur Verfügung, die eine solche Studie mit Spurenelement Quantifizierungen aus Kleinstmengen (wenige Mikroliter Serum) ermöglichen. Das Studiendesign wurde wie folgt konzipiert (Abbildung 27).

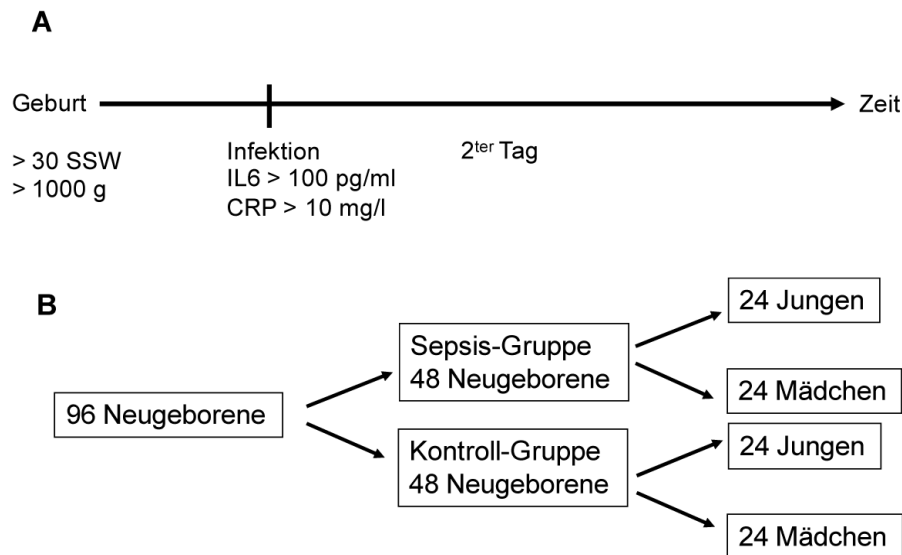


Abbildung 27: Studiendesign der klinischen Studie "Se und Schilddrüsenhormone bei Neugeborenen mit klinischer Sepsis" (A) Die Einschlusskriterien für die „Sepsis“-Gruppe beinhalteten ein Geburtsgewicht über 1000 g und die Entbindung nach der 30. Schwangerschaftswoche (SSW), sowie eine nachgewiesene Infektion durch IL-6 Serumspiegel von über 100 pg/ml oder einem CRP Wert größer als 10 mg/l. Serumproben werden bei Infektionsdiagnose und zwei Tage später zur Kontrolle der Antibiotikaspiegel gewonnen. (B) Studiendesign beinhaltet 96 Neugeborene, welche sich aufschlüsseln in „Sepsis-“ und "Kontroll-" Gruppe, welche die gleiche Anzahl an Jungen und Mädchen beinhalten.

Ziel der Studie war es, die Selenspiegel zu quantifizieren und mit dem klinischen Verlauf zu korrelieren. Die Einschlusskriterien von einem Geburtsgewicht über 1000 g und einer Entbindung nach der 30. Schwangerschaftswoche (SSW) sollten die Eltern der sehr unreif geborenen Kindern (unter 1000 g und vor der 30 SSW) vor mentalem Stress bewahren, da diese Kinder schon in eine Vielzahl anderer Studien eingeschlossen werden. Eine Infektion, nachgewiesen durch Serumspiegel von IL-6 größer als 100 pg/ml oder einem CRP Wert größer als 10 mg/l, führten zu einer Antibiotikatherapie, welche in der Regel das Aminoglykosid Gentamycin beinhaltet. Da Gentamycin in hohen Dosen starke Nebenwirkungen für das Neugeborene hat, wurde nach zwei Tagen der Therapieverlauf überprüft. Diese klinisch gerechtfertigten Restserumproben wurden ebenfalls von uns gesammelt und dienten der Korrelation von Selenspiegeln zum klinischen Verlauf. Ausschlusskriterien für die Aufnahme in die klinische Studie waren das Geburtsgewicht von unter 1000 g, ein Gestationsalter von unter 30+0 SSW, vorliegende genetische Erkrankungen, schwere Fehlbildungen, Auffälligkeiten beim Screening auf angeborene Stoffwechselerkrankungen, parenterale Zufuhr von Spurenelementen oder eine Geburt außerhalb der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

In besonderer Weise ist es spannend, in wie weit sich die Aminoglykosidbehandlung auf die Expression von SePP auswirkt. Wie in Abbildung 8 gezeigt führt das dem Gentamycin ähnliche und in der Zellkultur verwendete Geneticin (G418) zu einer deutlichen Verstärkung der SePP

Biosynthese *in-vitro*. HepG2 Zellen wurden mit 100 ng IL-6 für 24 Stunden mit dem transfizierten STAT-3 Reporter inkubiert. Die SePP Menge wurde nach 72 Stunden nach IL-6 und Se Costimulation quantifiziert (Abbildung 28).

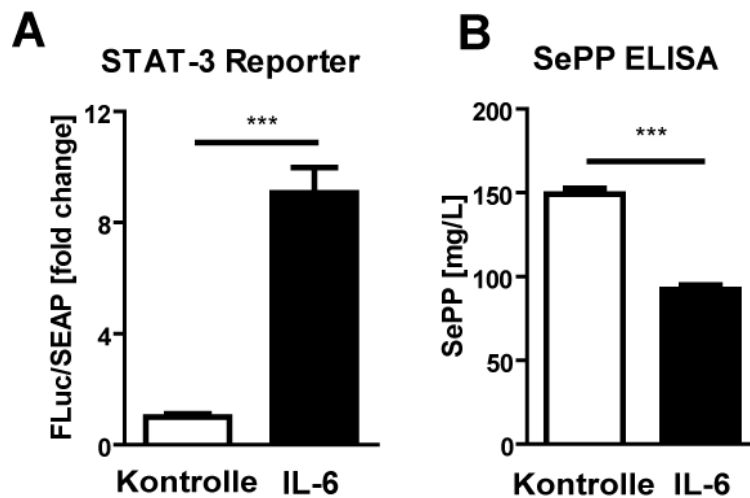


Abbildung 28: IL-6 inhibiert die SePP Expression in HepG2 Zellen. (A) Stimulation von HepG2 Zellen mit IL-6 (0,1 µg/ml, schwarzer Balken) wurde im Vergleich zu kontrollstimulierten Zellen (weiße Balken) mittels Reporteranalysen 48 Stunden nach Transfektion und 24 Stunden nach Mediumwechsel quantifiziert. SEAP Aktivität im Medium diente der Normalisierung (n=6). (B) SePP Spiegel wurden mit einem SePP ELISA quantifiziert (n=4). Alle Proben wurden mit Se mit und ohne IL-6 für 72 Stunden inkubiert. In Zusammenarbeit mit Janine Martitz (Statistik: Students T-test $p \leq 0,001$ ***).

Ebenfalls hatte das pro-inflammatorische Zytokin Il-6, welches in der Klinik als früher Inflammationsmarker dient, eine direkte Auswirkung auf die SePP Expression in HepG2 Zellen. IL-6 Stimulation von HepG2 Zellen führte zu einer fast 10-fach erhöhten STAT-3 induzierten Luciferase Aktivität, wobei die SePP Spiegel im Medium um 40% sanken.

Die klinische Studie rekrutiert fortlaufend Probanden. Die Ergebnisse werden zeigen, ob sich die Hypothesen, dass eine Aminoglykosidbehandlung die SePP Expression in den Neugeborenen scheinbar erhöht und das inflammatorische Zytokin IL-6 einen gegenteiligen Effekt hat, bewahrheiten. Das langfristige Ziel dieser Studie ist es, zu erkennen, wie schwer sich schon bei Neugeborenen die Hypoxie und Aminoglykosid-Behandlung auf die Selenoproteinbiosynthese und den Selenstatus auswirkt, und ob eine Supplementation mit Selen unter der Therapie erwogen werden sollte.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Sauerstoffversorgung für die Expression von Selenoproteinen und ihrer Biosynthesemaschinerie untersucht. Zum einen fokussierten sich die Arbeiten auf die Leber, als zentralen Ort der diätetischen Se-Verstoffwechselung und zum anderen auf primäre humane MSC, wichtig für die Regeneration und als Zellsystem, welches im Körper an hypoxische Bedingungen gewöhnt ist. Die Auswirkungen von verminderter Sauerstoffzufuhr waren in beiden Modellen stark unterschiedlich. So reagierte die Leberzelllinie mit einer verminderten Expression von Schlüsselenzymen der Selenoproteinbiosynthese, wohingegen MSC keine solche Reaktion auf eine verminderte Sauerstoffzufuhr zeigten. Hier war Se selber das Signal, die Biosyntheseproteine differentiell zu regulieren. Mögliche Erklärungen, Ursachen und Konsequenzen werden auch vor dem Hintergrund der begonnenen prospektiven klinischen Studie zu Spurenelementen bei Neugeborenen mit klinischer Sepsis diskutiert.

4.1 Hypoxie führt zu einer Umverteilung von Sec

Niedrige Selenwerte sind ein Risikofaktor für eine Reihe von Krankheiten wie Krebs, Entzündungen, kognitivem Verfall, Schlaganfall oder Schilddrüsenerkrankungen (Davis et al. 2012, Levander and Beck 1999, Berr et al. 2012, Koyama et al. 2009, Schomburg 2012). Genauso hilft eine Supplementation mit Se bei anderen schweren Erkrankungen wie Sepsis, autoimmuner Verfall der Schilddrüse, Schlaganfall oder Herzstillstand (Schomburg 2012, Angstwurm et al. 2007, Mehta et al. 2012, Reisinger et al. 2009).

Die molekularen Ursachen sind bisher noch nicht verstanden, auch ist wenig bekannt über die exakten Mechanismen, die zu einem Absinken der Serum Selenspiegel führen. Mit der Klonierung und Charakterisierung des SePP Promoters konnten eine Reihe von inflammatorischen Zytokinen sowie die TGF- β Signalkaskade als regulierend identifiziert werden (Mostert et al. 2001b, Mostert et al. 2001a, Dreher et al. 1997). Der Promoter von SeLS, wichtig für die Qualitätskontrolle von neu translatierten Proteinen, wird ebenfalls durch inflammatorische Zytokine und zusätzlich durch endoplasmatischen Stress reguliert (Gao et al. 2006, Gao et al. 2004). Die Injektion von LPS in der Maus, als Model der Akut-Phase Antwort, führt in der Leber zu einer Herunterregulation der Selenoproteinbiosynthese, Absinken der Serum Selenspiegel und zu einer Verschiebung in der Expression von SePP hin zu SeLS (Renko et al. 2009, Stoedter et al. 2010). Der molekulare Mechanismus der Umverteilung von Sec ist nicht verstanden. Eine *in-vivo* LPS Injektion führt neben einer starken pro-inflammatorischen Zytokin vermittelten Akut-Phase Antwort auch zu einer hypoxischen Leber, und kann daher

kausal nicht ausgeschlossen werden (James et al. 2002). Die Etablierung eines hypoxischen *in-vitro* Lebermodells ermöglichte die direkte Untersuchung der Regulation von Selenoproteinen und ihrer Biosynthese durch Selen und Hypoxie und erlaubte eine exakte Untersuchung des Zusammenspiels dieser Faktoren. In Übereinstimmung mit dem Model der Akut-Phase Antwort zeigte sich unter Hypoxie die verminderte Expression von SePP. SelS hingegen zeigte nach Se-Supplementation unter Hypoxie nur noch eine schwache Induktion. Dieser Trend war auch für andere Selenoproteine zu beobachten, wie die DIO1 Expression oder die Aktivität der GPX. Einzig GPX4 zeigte eine stabile bzw. sogar induzierte Expression. Hauptursache für eine niedrige Expression dieser Selenoproteine war eine Herunterregulation von Schlüsselenzymen der Selenoprotein Biosynthese, was zu einer verminderten Verfügbarkeit von Sec und dessen Umverteilung geführt hat (Abbildung 29).

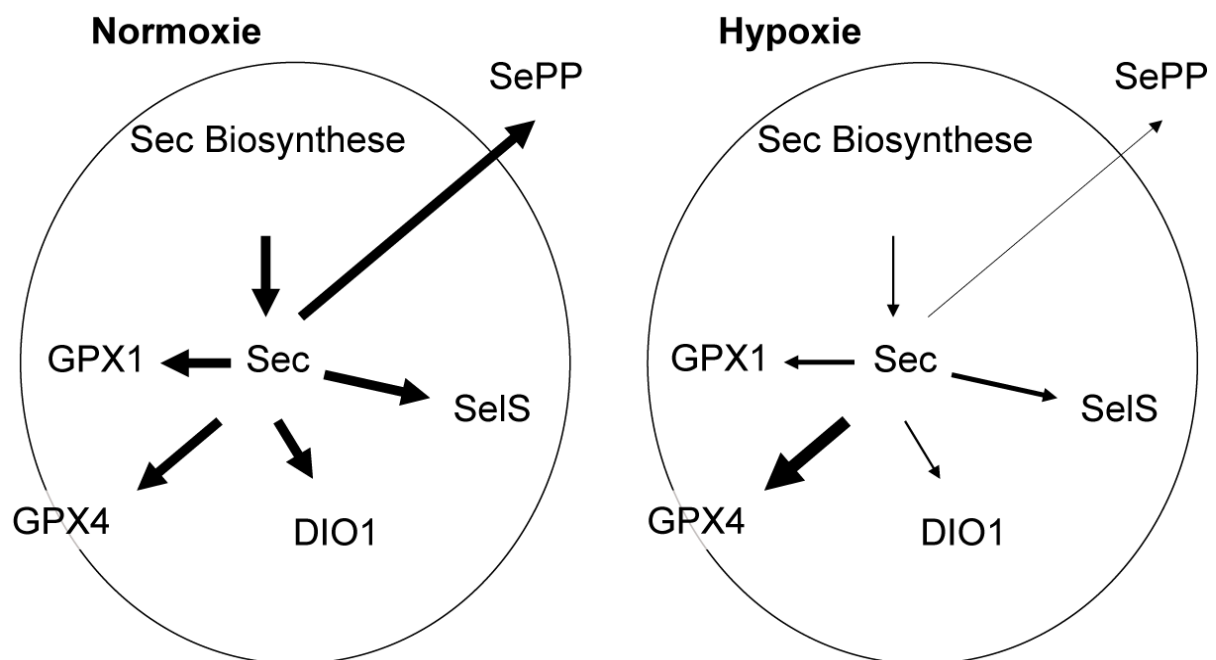


Abbildung 29: Umverteilung von Sec durch Hypoxie.

Die Ergebnisse in Zellkultur zeigen, dass unter Hypoxie das limitierende Sec verstärkt hin zu anderen, an der Hypoxie-Adaption beteiligten, Proteinen umverteilt wird. *GPX4* wurde unter Hypoxie sehr stark auf mRNA und Protein Ebene hochreguliert. *GPX4* ist als Sensor für oxidativen Stress essentiell für das Überleben von Zellen (Seiler et al. 2008). Ein Mangel an *GPX4* kann gerade unter Stressbedingungen zur Einleitung eines Suizidprogramms der Zellen, der sogenannten Ferroptose, führen (Yang et al. 2014). Die Vermeidung dieses Prozesses könnte den tieferen Sinn dieser Regulation darstellen.

4.2 Regulation der Sec Biosynthese ist HIF unabhängig

Eine induzierte Stabilisierung bzw. Destabilisierung der Biosynthesemaschinerie unter hypoxischen bzw. normoxischen Bedingungen hätte weitreichende Folgen für die Behandlung von entsprechend Krankheiten wie Sepsis, Polytrauma oder Krebs.

In unseren Studien konnten wir nicht das SECIS Element als Faktor für die Umverteilung von Sec definieren. Der Einfluss von SECIS auf die Expression von Selenoproteinen wurde bei Se limitierenden Bedingungen gezeigt (Latreche et al. 2012). In unseren Studien scheint eindeutig die Regulation durch eine verminderte Expression der Sec-Biosynthese von statten zu gehen. Gleichzeitig erhöhte sich die mRNA Expression von bestimmten Selenoproteinen. Das wenige Sec wird vermutlich spezifisch in die zum Zellüberleben wichtigen Proteine eingebaut (i.e. die Umverteilung von SePP zu GPX4). Dieses verhält sich ähnlich der Akut-Phase Antwort in der Maus mit einer Umverteilung von SePP zu SelS. Dieses Mausmodell zeichnet sich aber durch eine starke Entzündung aus (Stoedter et al. 2010). Die klassische Hypoxie Antwort wird über HIF Transkriptionsfaktoren vermittelt. So konnte gezeigt werden, dass HIF die Expression von GPX3 reguliert (Bierl et al. 2004).

Die Regulation von Selenoproteinen durch Hypoxie scheint unabhängig von HIF Transkriptionsfaktoren in HepG2 Zellen reguliert zu sein. Weder eine Überexpression von konstitutiv aktivem HIF1 α noch HIF2 α führte zu einer veränderten Expression von SePP oder GPX4. Auch die leberspezifische HIF1 α knock-out Maus zeigte keine Veränderung in Serum Selenspiegeln, welche hauptsächlich durch SePP bestimmt werden (Schomburg et al. 2003). In der Literatur ist ebenfalls eine HIF unabhängige Regulation von dem Selenoprotein TR1 durch Hypoxie beschrieben (Naranjo-Suarez et al. 2012). Ob in dem dort verwendeten Zellmodell auch eine Herunterregulation der gesamten Biosynthesemaschinerie ursächlich ist, bleibt genauso wie der die Biosynthesemaschinerie regulierende, für eine Therapie so spannende Faktor, ungeklärt. Es ist auch nicht auszuschließen, dass sich über die Evolution mehrere sauerstoffabhängige Selenoprotein-regulierende Mechanismen etabliert haben (Kaelin and Ratcliffe 2008).

4.3 Alternative Regulation des Selenoproteoms

Verschiedene Selenoproteine und Biosynthesegene werden auf mRNA Ebene durch Hypoxie reguliert (Abbildungen 8-14). Dies lässt auf einen gemeinsamen Mechanismus schließen. Diese Frage sollte durch die Verwendung von Reporter-gen-Assays geklärt werden. Bei einer Regulation der Promotoren durch Hypoxie hätte der regulierte Bereich eingegrenzt und so Aufschlüsse über den Mechanismus erlangt werden können. Leider zeigten die

Kernpromoterkonstrukte keine stärkere Regulation im Vergleich zum Leerplasmid, welches ebenfalls durch Hypoxie reguliert war. Alternativ können die regulierenden Gensequenzen in einer anderen Region liegen und wurden durch unsere Klonierungsstrategie nicht erfasst oder der Mechanismus ist postranskriptionell. So könnte ebenfalls die Halbwertszeit der mRNA durch Hypoxie verändert sein (Dibbens et al. 1999). Auffällig ist, dass die mRNA nur verändert ist, wenn Se unter hypoxischen Bedingungen supplementiert wird (z.B. eEFSec, PSTK, SePP oder SeLS). Dies würde für eine eventuelle Redox-sensitive Regulation sprechen, wie es zum Beispiel für NPGPX und Protein Kinase A gezeigt wurde (Chang et al. 2013). Weiterer Nährstoff für die Hypothese, dass die Se-Supplementation einen Einfluss auf die Hypoxie-Antwort hat, liefern die Daten des Aktivitäts- bzw. Expressionsassays zu den HIF-Reportern und HIF Zielgenen. So ist die Aktivität des HRE Luciferase Plasmides durch Se-Supplementation bei Transfektion der konstitutiv aktiven HIF Transkriptionsfaktoren vermindert. Ebenso reguliert die Se-Supplementation die Expression der HIF Zielegen *CA9* und *PGK1* unter Hypoxie, sowohl in HepG2 als auch in primären humanen MSC Zellen. Ein ähnlicher Effekt auf die Expression von HIF ist in Nierenkrebszellen nach der Behandlung mit Se-Methylselenocystein beobachtet worden (Chintala et al. 2012).

4.4 Evolution von Selenoproteinen und Sauerstoff

Besonders auffallend an der Selenoprotein-Biologie ist der Fakt, dass die 21. Aminosäure Sec durch ein Stopp-Codon rekodiert wird (Lee et al. 1989). Was zuerst in der Evolution vorhanden war, Stopp-Codon oder Sec, ist noch nicht geklärt. So ist denkbar, dass ein natürlicher Selektionsdruck zum Verschwinden von Sec geführt hat, oder dass die Natur nachdem der Baukasten mit 20 Aminosäuren angelegt war, das freie Stopp-Codon für die Rekodierung von Sec genutzt hat. Bemerkenswert ist, dass auch Archaeen und Bakterien über eine Vielzahl von Selenoproteinen verfügen (Stock and Rother 2009). Die Erde und die zu jeder Zeit dort lebenden Lebewesen haben drastische Veränderungen in der Sauerstoffkonzentration erlebt und mussten sich ihnen anpassen (Stamati et al. 2011). Die Annahme, dass Selenoproteine und ihre Biosynthese evolutionär älter sind als die in hochkomplexen Lebewesen etablierten Sauerstoff Adaptions- und Regulationsmechanismen, würde erklären, warum Selenoproteine und ihre Biosynthese nicht durch HIF Transkriptionsfaktoren reguliert sind.

4.5 Dynamische Expression von Selenoproteinen

Wie wichtig eine gute Selenversorgung bei plötzlicher Hypoxie ist, zeigt sich an einem Ischämie Modell in der Maus. Hier verschlimmert sich das Ausmaß der Erkrankung bei Fehlen

von GPX1 (Crack et al. 2001). GPX1 ist ein selenresponsives Selenoprotein und könnte neben der Neutralisation von ROS im Zytoplasma auch als intrazelluläres Se Speicherprotein dienen. Die starke Herunterregulation von SCLY, wichtig für das Abbauen von Selenoproteinen, zeigt, dass nach 72 Stunden Hypoxie die exprimierten Selenoproteine stabilisiert sind. Die Dynamiken der Verstoffwechselung von z.B. GPX1 oder besonders SePP sind nicht verstanden. Ein detailliertes molekulares Verständnis könnte insbesondere unter dem Gesichtspunkt von veränderter Aufnahme von SePP über LRP Rezeptoren, Abbau und Umverteilung von Sec, bei kritischen Erkrankungen eine Therapieoption darstellen.

4.6 Bedeutung des Glutamin Status für die Selenoprotein Biosynthese

Krebszellen in der Zellkultur haben einen hohen Bedarf an Glutamin (Medina 2001). Für die Krebszellen dient Glutamin als Stickstoff-Lieferant für Nukleotide und Aminosäuren Biosynthese, Aufnahme von essentiellen Aminosäuren und reguliert die Translation über den mTOR Signalweg. In entarteten Zellen stabilisiert Glutamin das mitochondriale Membranpotential, sowie NADPH Produktion und Redox-Kontrolle (Wise and Thompson 2010). Die Variation dieser Konzentration hat einen starken Effekt auf die SePP Expression in HepG2 Zellen, unabhängig von Hypoxie. Dies bedeutet, dass die verminderte Expression von SePP während einer Hypoxie nicht durch Glutamin hervorgerufen wird. Diese Effekte machen deutlich, wie wichtig die Mediumzusammensetzung zur optimalen Beurteilung und Vergleichbarkeit von Ergebnissen zwischen verschiedenen Laboren ist.

4.7 Hypoxie während der Differenzierung und Regeneration

Aufgrund ihrer großen Plastizität ruhen auf humanen MSC große Hoffnungen zur individualisierten Behandlung und zum „Tissue Engineering“. In den von uns durchgeführten Studien hatte Hypoxie keinen Effekt auf die Genexpression von Selenoproteinen oder der Sec-Biosynthesemaschinerie. Stattdessen führte die Gabe von physiologischen Mengen von Natrium Selenit zur starken Herunterregulation von Schlüsselenzymen (i.e. *PSTK*, *SEPSECS*, *SBP2*) der Biosynthese, was drastische Auswirkungen auf die Expression von Selenoproteinen vermuten lässt (Dumitrescu et al. 2005, Renko et al. 2009, Agamy et al. 2010). Im Körper befinden sich MSC in einer hypoxischen Nische; dies könnte die unterschiedliche Reaktion auf Hypoxie im Vergleich zum *in-vitro* Lebermodell erklären (Haque et al. 2013). Weiterhin deutet dieser Befund auf eine zell- bzw. gewebespezifische Regulation von Selenoproteinen durch Hypoxie hin. Eine durch Se selber hervorgerufen, stark hemmende Wirkung auf die Selenoprotein Biosynthese ist in der Literatur nicht bekannt und könnte Aufschluss über

regulatorische Mechanismen dieser Regulation geben. Darüber hinaus kann dieses Zellmodell dazu dienen, die Selenform-spezifischen Transporter und ihre molekulare Regulation zu erforschen. Es ist davon auszugehen, dass auch die Aufnahme bzw. der Transport reguliert ist. Alternativ könnte die hier beobachtete seleninduzierte Regulation der Biosynthese auch eine Gegenregulation der um ihre „stemness“ bemühten MSC Zellen widerspiegeln. Das chondrogene MSC Differenzierungsprotokoll beinhaltet Se und Hypoxie (Ullah et al. 2012, Haque et al. 2013). Ein anderer Stimulus zur chondrogenen Differenzierung, TGF- β , ist bereits beschrieben, da er über die SMAD Signalkaskade den SePP Promoter reguliert (Mostert et al. 2001a). Die Auswirkungen der SMAD Signalkaskade auf die Selenoprotein Biosynthese sind bisher noch nicht erforscht. Auch die Kashin-Beck Krankheit zeichnet sich durch Selenmangel und eine fehlerhafte Verknöcherung aus (Fairweather-Tait et al. 2011, Moreno-Reyes et al. 1998). Weitere Arbeiten zu dem Zusammenspiel von Selenmetabolismus, Selenoproteinen und dem TGF- β Signalweg in plastischen MSC eröffnen große Möglichkeiten zu einem besseren Verständnis dieser Krankheit und dem Einfluss des Selenstatus auf die Differenzierung und somit das Heilen von z.B. Knochenbrüchen.

4.8 Klinische Studie: Se bei Polytrauma-Patienten

Die Zukunft wird zeigen, ob die *in-vitro* beobachteten, starken Effekte der Umverteilung von SePP zu GPX4 auch im Menschen oder gar in der Klinik bei der Behandlung von erkrankten Menschen von Relevanz sind. Das Konzept der Umverteilung könnte das Absinken von Selenspiegeln im Serum bei kritischen Erkrankungen erklären.

Die signifikante Korrelation von Se zur Überlebenswahrscheinlichkeit, berechnet durch den APACHE 2 Score bei Polytrauma-Patienten ist im Einklang mit Daten aus anderen kritischen Erkrankungen wie Nierenkrebs (Meyer et al. 2012). Auch hier zeigte sich eine positive Korrelation des Selentransporters SePP mit der Überlebensrate. Eine Erklärung, warum keine Korrelation zu dem tatsächlichen Überleben der Polytrauma Patienten festzustellen war, ist vermutlich in der kleinen Studiengröße zu finden.

Die positive Korrelation von Se-Spiegeln mit der Lungenfunktion, dargestellt durch den Horovitz Index, könnte Folge des Organschadens der Lunge sein und Ausdruck der Schädigung des Körpers. Andererseits könnte auch eine verminderte Lungenfunktion ursächlich für die niedrigen Serum Se-Spiegel sein und würde somit ein erstes Indiz für die Regulation von Se im menschlichen Körper durch Sauerstoffmangel liefern.

Weitere Studien zur Korrelation der tatsächlichen Sauerstoffsättigung mit Se und SePP werden die Diskussion zu der Bedeutung von Sauerstoffversorgung und Expression von Selenoproteinen und deren Bedeutung für das Überleben bei schweren Erkrankungen unterstützen. Leider gibt es noch keinen Surrogatmarker, der spezifisch für Leberhypoxie im Menschen ist. Es bleibt auch die Frage zu beantworten, inwieweit die beobachteten Effekte organspezifisch sind, oder sich in vielen Geweben unter hypoxischen Bedingungen zeigen.

4.9 Klinische Studie: Se bei Neugeborenen

Neugeborene verfügen über einen schlechten Selenstatus und brauchen Zeit, um Se über die Muttermilch in Form von SePP aufzunehmen (Loui et al. 2008). Der Mechanismus wurde molekular im Mausmodell aufgezeigt (Hill et al. 2014).

Wie wichtig eine gute Selenversorgung ist, wird nicht nur anhand der Kashin-Beck Krankheit deutlich, auch beim Betrachten des SePP knock-out Mausmodells ist der Phänotyp sehr stark vom Selenstatus abhängig. Ohne Supplementation zeichnen sich die SePP knock-out Mäuse durch sehr niedrige Serum Selenspiegel und eine Vielzahl von Defekten, wie Kleinwuchs oder epileptische Anfälle aus (Schomburg et al. 2003). Frühgeborene haben ein erhöhtes Risiko, neuronale Defizite im späteren Leben zu entwickeln (Grunewaldt et al. 2014). Von einer besonderen Bedeutung wird daher die Rolle von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 auf die Se und SePP Spiegel im Serum oder Plasma von Neugeborenen mit einer Infektion sein. Erste Daten aus der Zellkultur weisen auf eine Regulation von SePP durch IL-6 hin (Janine Martitz et al., unveröffentlicht). In der Literatur ist eine Regulation von Ceruloplasmin und Kupfer durch IL-6 beschrieben (Conley et al. 2005). Interessanterweise gibt sowohl Se und Kupfer als auch der Quotient aus beiden Elementen Aufschluss über den Schilddrüsenhormonhaushalt und könnte als Surrogatmarker dienen (Mittag et al. 2012, Mittag et al. 2010). Wie wichtig eine adäquate Schilddrüsenhormonversorgung insbesondere in dieser frühen kindlichen Entwicklung ist, zeigt sich anhand der konnatalen Hypothyreose, die schwerste neuronale Schäden hervorruft, aber heutzutage schon beim Neugeborenen Screening entdeckt und behandelt wird (Gruters and Krude 2012). Der Se-Kupfer Quotient könnte dennoch Aufschluss und einzigartige Einblicke von hoher klinischer Relevanz ermöglichen, insbesondere vor dem Hintergrund des bei Infektionen auftretenden Low T3 Syndroms (Boelen et al. 2011). Die technische Weiterentwicklung in Form des TXRF S2 Picofox (Bruker) ermöglicht eine exakte Multiparameter-Spurenelementanalytik. Das dem in der Neonatologie oft verwendeten Gentamycin ähnliche Geneticin hat starke Effekte auf die SePP Expression *in-vitro*. Hier wird es von großer Bedeutung sein, ob sich der Se/SePP und der Se/Cu Quotient

während einer Antibiotika-Therapie ändert, was für eine Fehlkodierung mit nicht selenhaltigen Aminosäuren und eine gestörte Schilddrüsenhormonhomöostase sprechen würde. Dies wäre die Grundlage für eine gezielte Supplementation, welche aber streng gemonitort und auf Patienten mit nachgewiesenem Mangel beschränkt werden müsste. Nicht nur können hohe Dosen von Se toxisch sein, sondern können auch die Genexpression, wie an dem Beispiel MSC deutlich wurde, in unkontrollierter Art und Weise verändern.

4.10 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurden grundlegende Experimente zur Regulation der Selenoprotein Biosynthese durchgeführt. Die Ergebnisse sind geeignet, um das Verständnis der Ergebnisse von klinischen Studien zur Bedeutung des Selenstatus bei neonataler Infektion, bei der Antibiotikatherapie und bei Patienten mit Polytrauma zu verbessern. Gerade die hier gezeigten Versuche zur Bedeutung des Selenstatus und zu den Effekten einer Selensupplementation sind geeignet, die geplanten Selensupplementationsversuche in diesen Erkrankungen molekular zu begründen und zu interpretieren.

In-vitro wurden zwei aussagekräftige Zellkultursysteme untersucht, in denen eine Herunterregulation von Schlüsselenzymen der Sec-Biosynthese unter den Versuchsbedingungen beobachtet wurde. Die Stimuli unterschieden sich jedoch; bei hepatischen Zellen war Hypoxie und bei MSC Se selber der auslösende Faktor. In beiden Systemen ist der molekulare Mechanismus nicht verstanden, bietet aber einen idealen Startpunkt für weiterführende Analysen. Ein besseres Verständnis der Sec-Biosynthese regulierenden molekularen Mechanismen könnte, wenn pharmakologisch adressierbar, ein gezieltes An- und Ausschalten von Selenoproteinen ermöglichen. Dies könnte zum einen während kritischer Erkrankungen, welche durch verminderte SePP Serumspiegel charakterisiert sind, helfen oder bei Tumorerkrankungen die Chemotherapie unterstützen, um so die Redox-Abwehr des Tumors gezielt zu schwächen.

Nun sollte es besser möglich sein, klinische Studien, in denen Hypoxie und der Selenstatus von Bedeutung sind, zu planen, zu interpretieren und molekular zu verstehen, wie z.B. die hier in dieser Arbeit diskutierte Studie von Se bei Polytrauma-Patienten und Neugeborenen mit Sepsis. Überdies deutet diese Arbeit an, dass eine Vermeidung von Hypoxie positiv auf den Selenstatus wirkt und die Selenoprotein-Expression verbessert, was von therapeutischer Bedeutung sein könnte. Diese Erkenntnis wird auch dadurch unterstützt, dass in dieser Arbeit wieder gezeigt werden konnte, dass eine experimentelle Erhöhung des Selenangebots (Selensupplementation), die suppressierte Syntheserate verbessern kann. Dieses Ergebnis unterstützt die gegenwärtigen

Tendenzen, eine Selensupplementation in schwere Erkrankungen zu erwägen und zur Routineunterstützung als adjuvante Therapie einzuführen.

5. Literaturverzeichnis:

- AGAMY O ET AL. 2010. Mutations disrupting selenocysteine formation cause progressive cerebello-cerebral atrophy. *American journal of human genetics* 87: 538-544.
- ALFTHAN G ET AL. 2014. Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: From deficiency to optimal selenium status of the population. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*.
- ALHAZZANI W ET AL. 2013. The effect of selenium therapy on mortality in patients with sepsis syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical care medicine* 41: 1555-1564.
- ANGSTWURM MW ET AL. 2007. Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. *Critical care medicine* 35: 118-126.
- ARAGONES J, FRAISL P, BAES M AND CARMELIET P. 2009. Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell metabolism* 9: 11-22.
- ARBOGAST S AND FERREIRO A. 2010. Selenoproteins and protection against oxidative stress: selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling and calcium homeostasis. *Antioxidants & redox signaling* 12: 893-904.
- ARNER ES. 2010. Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Experimental cell research* 316: 1296-1303.
- ARNER ES AND HOLMGREN A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European journal of biochemistry / FEBS* 267: 6102-6109.
- ATSHAVES BP, MARTIN GG, HOSTETLER HA, MCINTOSH AL, KIER AB AND SCHROEDER F. 2010. Liver fatty acid-binding protein and obesity. *The Journal of nutritional biochemistry* 21: 1015-1032.
- BANERJEE CK AND SANI BP. 1982. Selenium binding proteins in rat tissues. *Biochemical and biophysical research communications* 109: 210-216.
- BANSAL MP, OBORN CJ, DANIELSON KG AND MEDINA D. 1989. Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver. *Carcinogenesis* 10: 541-546.
- BECK MA, SHI Q, MORRIS VC AND LEVANDER OA. 1995. Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates. *Nature medicine* 1: 433-436.
- BEHNE D, KYRIAKOPOULOS A, MEINHOLD H AND KOHRLE J. 1990. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochemical and biophysical research communications* 173: 1143-1149.
- BEIN T AND PFEIFER M. 2007. Intensivbuch Lunge. *Klinische Pathophysiologie und Praxis der Intensivbehandlung*. Taschenbuch.
- BELLINGER FP, RAMAN AV, REEVES MA AND BERRY MJ. 2009. Regulation and function of selenoproteins in human disease. *The Biochemical journal* 422: 11-22.

- BENHAR M, FORRESTER MT, HESS DT AND STAMLER JS. 2008. Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science* 320: 1050-1054.
- BENITA Y, KIKUCHI H, SMITH AD, ZHANG MQ, CHUNG DC AND XAVIER RJ. 2009. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic acids research* 37: 4587-4602.
- BERMANO G, NICOL F, DYER JA, SUNDE RA, BECKETT GJ, ARTHUR JR AND HESKETH JE. 1995. Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *The Biochemical journal* 311 (Pt 2): 425-430.
- BERR C, ARNAUD J AND AKBARALY TN. 2012. Selenium and cognitive impairment: a brief-review based on results from the EVA study. *BioFactors* 38: 139-144.
- BIANCO P, CAO X, FRENETTE PS, MAO JJ, ROBEY PG, SIMMONS PJ AND WANG CY. 2013. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature medicine* 19: 35-42.
- BIERL C, VOETSCH B, JIN RC, HANDY DE AND LOSCALZO J. 2004. Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression. *The Journal of biological chemistry* 279: 26839-26845.
- BIRNBOIM HC AND DOLY J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7: 1513-1523.
- BIRINGER M, PILAWA S AND FLOHE L. 2002. Trends in selenium biochemistry. *Natural product reports* 19: 693-718.
- BLAZINA T, SUN Y, VOEGELIN A, LENZ M, BERG M AND WINKEL LH. 2014. Terrestrial selenium distribution in China is potentially linked to monsoonal climate. *Nature communications* 5: 4717.
- BOELEN A, KWAKKEL J AND FLIERS E. 2011. Beyond low plasma T3: local thyroid hormone metabolism during inflammation and infection. *Endocrine reviews* 32: 670-693.
- BONDAREVA AA ET AL. 2007. Effects of thioredoxin reductase-1 deletion on embryogenesis and transcriptome. *Free radical biology & medicine* 43: 911-923.
- BRIGELIUS-FLOHE R. 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free radical biology & medicine* 27: 951-965.
- BRIGELIUS-FLOHE R. 2006. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biological chemistry* 387: 1329-1335.
- BRIGELIUS-FLOHE R AND KIPP A. 2009. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1790: 1555-1568.
- BRIGELIUS-FLOHE R AND MAIORINO M. 2013. Glutathione peroxidases. *Biochimica et biophysica acta* 1830: 3289-3303.
- BUIJSSE B, LEE DH, STEFFEN L, ERICKSON RR, LUEPKER RV, JACOBS DR, JR. AND HOLTZMAN JL. 2012. Low serum glutathione peroxidase activity is associated with increased cardiovascular mortality in individuals with low HDLc's. *PloS one* 7: e38901.
- BUNN HF. 2013. Erythropoietin. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3: a011619.
- BURK RF AND HILL KE. 2009. Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochimica et biophysica acta* 1790: 1441-1447.
- BURK RF, HILL KE AND MOTLEY AK. 2001. Plasma selenium in specific and non-specific forms. *BioFactors* 14: 107-114.
- BURK RF, HILL KE, OLSON GE, WEEBER EJ, MOTLEY AK, WINFREY VP AND AUSTIN LM. 2007. Deletion of apolipoprotein E receptor-2 in mice lowers brain selenium and causes severe neurological dysfunction and death when a low-selenium diet is fed. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 6207-6211.

- CARLSON BA, XU XM, KRYUKOV GV, RAO M, BERRY MJ, GLADYSHEV VN AND HATFIELD DL. 2004. Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]Sec kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 12848-12853.
- CHANG YC, YU YH, SHEW JY, LEE WJ, HWANG JJ, CHEN YH, CHEN YR, WEI PC, CHUANG LM AND LEE WH. 2013. Deficiency of NPGPx, an oxidative stress sensor, leads to obesity in mice and human. *EMBO molecular medicine* 5: 1165-1179.
- CHINTALA S, NAJRANA T, TOTH K, CAO S, DURRANI FA, PILI R AND RUSTUM YM. 2012. Prolyl hydroxylase 2 dependent and Von-Hippel-Lindau independent degradation of Hypoxia-inducible factor 1 and 2 alpha by selenium in clear cell renal cell carcinoma leads to tumor growth inhibition. *BMC cancer* 12: 293.
- CHIU-UGALDE J, THEILIG F, BEHRENDTS T, DREBES J, SIELAND C, SUBBARAYAL P, KOHRLE J, HAMMES A, SCHOMBURG L AND SCHWEIZER U. 2010. Mutation of megalin leads to urinary loss of selenoprotein P and selenium deficiency in serum, liver, kidneys and brain. *The Biochemical journal* 431: 103-111.
- CHOMCZYNSKI P AND SACCHI N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162: 156-159.
- CHRISTENSEN LC, JENSEN NW, VALA A, KAMARAUSKAITE J, JOHANSSON L, WINTHER JR, HOFMANN K, TEILUM K AND ELLGAARD L. 2012. The human selenoprotein VCP-interacting membrane protein (VIMP) is non-globular and harbors a reductase function in an intrinsically disordered region. *The Journal of biological chemistry* 287: 26388-26399.
- CLARK LC ET AL. 1996. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. *Nutritional Prevention of Cancer Study Group. JAMA : the journal of the American Medical Association* 276: 1957-1963.
- CONLEY L, GEURS TL AND LEVIN LA. 2005. Transcriptional regulation of ceruloplasmin by an IL-6 response element pathway. *Brain research Molecular brain research* 139: 235-241.
- CONRAD M ET AL. 2004. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Molecular and cellular biology* 24: 9414-9423.
- CONRAD M AND SCHWEIZER U. 2010. Unveiling the molecular mechanisms behind selenium-related diseases through knockout mouse studies. *Antioxidants & redox signaling* 12: 851-865.
- COPELAND PR AND DRISCOLL DM. 1999. Purification, redox sensitivity, and RNA binding properties of SECIS-binding protein 2, a protein involved in selenoprotein biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 274: 25447-25454.
- COPELAND PR, FLETCHER JE, CARLSON BA, HATFIELD DL AND DRISCOLL DM. 2000. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *The EMBO journal* 19: 306-314.
- COPELAND PR, STEPANIK VA AND DRISCOLL DM. 2001. Insight into mammalian selenocysteine insertion: domain structure and ribosome binding properties of Sec insertion sequence binding protein 2. *Molecular and cellular biology* 21: 1491-1498.
- CRACK PJ, TAYLOR JM, FLENTJAR NJ, DE HAAN J, HERTZOG P, IANNELLO RC AND KOLA I. 2001. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *Journal of neurochemistry* 78: 1389-1399.
- CURRAN JE ET AL. 2005. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nature genetics* 37: 1234-1241.

- DASKALOW K, ROHWER N, RASKOPF E, DUPUY E, KUHL A, LODDENKEMPER C, WIEDENMANN B, SCHMITZ V AND CRAMER T. 2010. Role of hypoxia-inducible transcription factor 1alpha for progression and chemosensitivity of murine hepatocellular carcinoma. *Journal of molecular medicine* 88: 817-827.
- DAVIS BD. 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiological reviews* 51: 341-350.
- DAVIS CD, TSUJI PA AND MILNER JA. 2012. Selenoproteins and cancer prevention. *Annual review of nutrition* 32: 73-95.
- DENTICE M AND SALVATORE D. 2011. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local impact of thyroid hormone inactivation. *The Journal of endocrinology* 209: 273-282.
- DEVARAJAN P. 2011. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Current opinion in pediatrics* 23: 194-200.
- DIBBENS JA, MILLER DL, DAMERT A, RISAU W, VADAS MA AND GOODALL GJ. 1999. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation of multiple RNA elements. *Molecular biology of the cell* 10: 907-919.
- DREHER I, JAKOBS TC AND KOHRLE J. 1997. Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter. Response of selenoprotein P expression to cytokines in liver cells. *The Journal of biological chemistry* 272: 29364-29371.
- DUFFIELD-LILLICO AJ, DALKIN BL, REID ME, TURNBULL BW, SLATE EH, JACOBS ET, MARSHALL JR, CLARK LC AND NUTRITIONAL PREVENTION OF CANCER STUDY G. 2003. Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *BJU international* 91: 608-612.
- DUMITRESCU AM, LIAO XH, ABDULLAH MS, LADO-ABEAL J, MAJED FA, MOELLER LC, BORAN G, SCHOMBURG L, WEISS RE AND REFETOFF S. 2005. Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nature genetics* 37: 1247-1252.
- DUNN BK, RICHMOND ES, MINASIAN LM, RYAN AM AND FORD LG. 2010. A nutrient approach to prostate cancer prevention: The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Nutrition and cancer* 62: 896-918.
- FAGEGALTIER D, HUBERT N, YAMADA K, MIZUTANI T, CARBON P AND KROL A. 2000. Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *The EMBO journal* 19: 4796-4805.
- FAIRWEATHER-TAIT SJ, BAO Y, BROADLEY MR, COLLINGS R, FORD D, HESKETH JE AND HURST R. 2011. Selenium in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling* 14: 1337-1383.
- FLOHE L, TOPPO S, COZZA G AND URSINI F. 2011. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxidants & redox signaling* 15: 763-780.
- FORCEVILLE X, VITOUX D, GAUZIT R, COMBES A, LAHILAIRE P AND CHAPPUIS P. 1998. Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients. *Critical care medicine* 26: 1536-1544.
- FORREST D AND VENNSTROM B. 2000. Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 10: 41-52.
- FRADEJAS N, CARLSON BA, RIJNTJES E, BECKER NP, TOBE R AND SCHWEIZER U. 2013. Mammalian Trit1 is a tRNA([Ser]Sec)-isopentenyl transferase required for full selenoprotein expression. *The Biochemical journal* 450: 427-432.
- GAO Y, FENG HC, WALDER K, BOLTON K, SUNDERLAND T, BISHARA N, QUICK M, KANTHAM L AND COLLIER GR. 2004. Regulation of the selenoprotein Sels

- by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress - SelS is a novel glucose-regulated protein. *FEBS letters* 563: 185-190.
- GAO Y, HANNAN NR, WANYONYI S, KONSTANTOPOLOUS N, PAGNON J, FENG HC, JOWETT JB, KIM KH, WALDER K AND COLLIER GR. 2006. Activation of the selenoprotein SEPS1 gene expression by pro-inflammatory cytokines in HepG2 cells. *Cytokine* 33: 246-251.
- GELPI C, SONTHEIMER EJ AND RODRIGUEZ-SANCHEZ JL. 1992. Autoantibodies against a serine tRNA-protein complex implicated in cotranslational selenocysteine insertion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 9739-9743.
- GEREBEN B, ZAVACKI AM, RIBICH S, KIM BW, HUANG SA, SIMONIDES WS, ZEOLD A AND BIANCO AC. 2008. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocrine reviews* 29: 898-938.
- GRUNEWALDT KH, FJORTOFT T, BJULAND KJ, BRUBAKK AM, EIKENES L, HABERG AK, LOHAUGEN GC AND SKRANES J. 2014. Follow-up at age 10years in ELBW children - Functional outcome, brain morphology and results from motor assessments in infancy. *Early human development* 90: 571-578.
- GRUTERS A AND KRUDE H. 2012. Detection and treatment of congenital hypothyroidism. *Nature reviews Endocrinology* 8: 104-113.
- HAASE VH. 2013. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood reviews* 27: 41-53.
- HANAHAHAN D AND WEINBERG RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
- HANCOCK JT, DESIKAN R AND NEILL SJ. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society transactions* 29: 345-350.
- HANDY DE, HANG G, SCOLARO J, METES N, RAZAQ N, YANG Y AND LOSCALZO J. 2006. Aminoglycosides decrease glutathione peroxidase-1 activity by interfering with selenocysteine incorporation. *The Journal of biological chemistry* 281: 3382-3388.
- HAQUE N, RAHMAN MT, ABU KASIM NH AND ALABSI AM. 2013. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *TheScientificWorldJournal* 2013: 632972.
- HATFIELD DL, CARLSON BA, XU XM, MIX H AND GLADYSHEV VN. 2006. Selenocysteine incorporation machinery and the role of selenoproteins in development and health. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 81: 97-142.
- HATFIELD DL AND GLADYSHEV VN. 2002. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Molecular and cellular biology* 22: 3565-3576.
- HERZ J AND BOCK HH. 2002. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annual review of biochemistry* 71: 405-434.
- HESSE-BAHR K, DREHER I AND KOHRLE J. 2000. The influence of the cytokines Il-1beta and INFgamma on the expression of selenoproteins in the human hepatocarcinoma cell line HepG2. *BioFactors* 11: 83-85.
- HILL KE, MOTLEY AK, WINFREY VP AND BURK RF. 2014. Selenoprotein P is the major selenium transport protein in mouse milk. *PloS one* 9: e103486.
- HIROSAWA-TAKAMORI M, JACKLE H AND VORBRUGGEN G. 2000. The class 2 selenophosphate synthetase gene of *Drosophila* contains a functional mammalian-type SECIS. *EMBO reports* 1: 441-446.
- HOFMANN PJ, SCHOMBURG L AND KOHRLE J. 2009. Interference of endocrine disrupters with thyroid hormone receptor-dependent transactivation. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 110: 125-137.

- HOLLENBACH B, MORGENTHALER NG, STRUCK J, ALONSO C, BERGMANN A, KOHRLE J AND SCHOMBURG L. 2008. New assay for the measurement of selenoprotein P as a sepsis biomarker from serum. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements* 22: 24-32.
- HUANG TS, SHYU YC, CHEN HY, LIN LM, LO CY, YUAN SS AND CHEN PJ. 2013. Effect of parenteral selenium supplementation in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis. *PloS one* 8: e54431.
- HUGHES DJ ET AL. 2014. Selenium status is associated with colorectal cancer risk in the European prospective investigation of cancer and nutrition cohort. *International journal of cancer Journal international du cancer*.
- IMAI H, HIRAO F, SAKAMOTO T, SEKINE K, MIZUKURA Y, SAITO M, KITAMOTO T, HAYASAKA M, HANAOKA K AND NAKAGAWA Y. 2003. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochemical and biophysical research communications* 305: 278-286.
- JAMES PE, MADHANI M, ROEBUCK W, JACKSON SK AND SWARTZ HM. 2002. Endotoxin-induced liver hypoxia: defective oxygen delivery versus oxygen consumption. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 6: 18-28.
- KAELIN WG, JR. AND RATCLIFFE PJ. 2008. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell* 30: 393-402.
- KEITH B, JOHNSON RS AND SIMON MC. 2012. HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews Cancer* 12: 9-22.
- KIM KH, GAO Y, WALDER K, COLLIER GR, SKELTON J AND KISSEBAH AH. 2007. SEPS1 protects RAW264.7 cells from pharmacological ER stress agent-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 354: 127-132.
- KLEIN EA ET AL. 2011. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA : the journal of the American Medical Association* 306: 1549-1556.
- KNAUS WA, DRAPER EA, WAGNER DP AND ZIMMERMAN JE. 1985. APACHE II: a severity of disease classification system. *Critical care medicine* 13: 818-829.
- KOLLMUS H, FLOHE L AND MCCARTHY JE. 1996. Analysis of eukaryotic mRNA structures directing cotranslational incorporation of selenocysteine. *Nucleic acids research* 24: 1195-1201.
- KOYAMA H, ABDULAH R, OHKUBO T, IMAI Y, SATOH H AND NAGAI K. 2009. Depressed serum selenoprotein P: possible new predictor of increased risk for cerebrovascular events. *Nutrition research* 29: 94-99.
- KRISHNAN J ET AL. 2012. Dietary obesity-associated Hif1alpha activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD+ system. *Genes & development* 26: 259-270.
- KRYUKOV GV, CASTELLANO S, NOVOSELOV SV, LOBANOV AV, ZEHTAB O, GUIGO R AND GLADYSHEV VN. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300: 1439-1443.
- KUROKAWA S, BELLINGER FP, HILL KE, BURK RF AND BERRY MJ. 2014. Isoform-specific binding of selenoprotein P to the beta-propeller domain of apolipoprotein E receptor 2 mediates selenium supply. *The Journal of biological chemistry* 289: 9195-9207.
- KUROKAWA S, TAKEHASHI M, TANAKA H, MIHARA H, KURIHARA T, TANAKA S, HILL K, BURK R AND ESAKI N. 2011. Mammalian selenocysteine lyase is involved in selenoprotein biosynthesis. *Journal of nutritional science and vitaminology* 57: 298-305.

- LACLAUSTRA M, STRANGES S, NAVAS-ACIEN A, ORDOVAS JM AND GUALLAR E. 2010. Serum selenium and serum lipids in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004. *Atherosclerosis* 210: 643-648.
- LATRECHE L, DUHIEU S, TOUAT-HAMICI Z, JEAN-JEAN O AND CHAVATTE L. 2012. The differential expression of glutathione peroxidase 1 and 4 depends on the nature of the SECIS element. *RNA biology* 9: 681-690.
- LEE BJ, WORLAND PJ, DAVIS JN, STADTMAN TC AND HATFIELD DL. 1989. Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA. *The Journal of biological chemistry* 264: 9724-9727.
- LEIBOVICI L, VIDAL L AND PAUL M. 2009. Aminoglycoside drugs in clinical practice: an evidence-based approach. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 63: 246-251.
- LEVANDER OA AND BECK MA. 1999. Selenium and viral virulence. *British medical bulletin* 55: 528-533.
- LIPPMAN SM ET AL. 2009. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA : the journal of the American Medical Association* 301: 39-51.
- LOBODA A, JOZKOWICZ A AND DULAK J. 2010. HIF-1 and HIF-2 transcription factors-similar but not identical. *Molecules and cells* 29: 435-442.
- LOSCALZO J. 2014. Keshan disease, selenium deficiency, and the selenoproteome. *The New England journal of medicine* 370: 1756-1760.
- LOUI A, RAAB A, BRAETTER P, OBLADEN M AND DE BRAETTER VN. 2008. Selenium status in term and preterm infants during the first months of life. *European journal of clinical nutrition* 62: 349-355.
- LOUI A, RAAB A, MAIER RF, BRATTER P AND OBLADEN M. 2010. Trace elements and antioxidant enzymes in extremely low birthweight infants. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements* 24: 111-118.
- LU J AND HOLMGREN A. 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free radical biology & medicine* 66: 75-87.
- MAITI B, ARBOGAST S, ALLAMAND V, MOYLE MW, ANDERSON CB, RICHARD P, GUICHENEY P, FERREIRO A, FLANIGAN KM AND HOWARD MT. 2009. A mutation in the SEPNI selenocysteine redefinition element (SRE) reduces selenocysteine incorporation and leads to SEPNI-related myopathy. *Human mutation* 30: 411-416.
- MAKHOUL IR, SAMMOUR RN, DIAMOND E, SHOHAT I, TAMIR A AND SHAMIR R. 2004. Selenium concentrations in maternal and umbilical cord blood at 24-42 weeks of gestation: basis for optimization of selenium supplementation to premature infants. *Clinical nutrition* 23: 373-381.
- MALINOUSKI M, HASAN NM, ZHANG Y, SERAVALLI J, LIN J, AVANESOV A, LUTSENKO S AND GLADYSHEV VN. 2014. Genome-wide RNAi ionomics screen reveals new genes and regulation of human trace element metabolism. *Nature communications* 5: 3301.
- MARCOCCI C ET AL. 2011. Selenium and the course of mild Graves' orbitopathy. *The New England journal of medicine* 364: 1920-1931.
- MARTIN R, MOGG AE, HEYWOOD LA, NITSCHKE L AND BURKE JF. 1989. Aminoglycoside suppression at UAG, UAA and UGA codons in *Escherichia coli* and human tissue culture cells. *Molecular & general genetics* : MGG 217: 411-418.
- MEDINA MA. 2001. Glutamine and cancer. *The Journal of nutrition* 131: 2539S-2542S; discussion 2550S-2531S.

- MEHTA SL, KUMARI S, MENDELEV N AND LI PA. 2012. Selenium preserves mitochondrial function, stimulates mitochondrial biogenesis, and reduces infarct volume after focal cerebral ischemia. *BMC neuroscience* 13: 79.
- MEYER HA, ENDERMANN T, STEPHAN C, STOEDTER M, BEHRENDT T, WOLFF I, JUNG K AND SCHOMBURG L. 2012. Selenoprotein P status correlates to cancer-specific mortality in renal cancer patients. *PloS one* 7: e46644.
- MIHARA H, KURIHARA T, WATANABE T, YOSHIMURA T AND ESAKI N. 2000. cDNA cloning, purification, and characterization of mouse liver selenocysteine lyase. Candidate for selenium delivery protein in selenoprotein synthesis. *The Journal of biological chemistry* 275: 6195-6200.
- MITTAG J, BEHRENDT T, HOEFIG CS, VENNSTROM B AND SCHOMBURG L. 2010. Thyroid hormones regulate selenoprotein expression and selenium status in mice. *PloS one* 5: e12931.
- MITTAG J, BEHRENDT T, NORDSTROM K, ANSELMO J, VENNSTROM B AND SCHOMBURG L. 2012. Serum copper as a novel biomarker for resistance to thyroid hormone. *The Biochemical journal* 443: 103-109.
- MORENO-REYES R, SUETENS C, MATHIEU F, BEGAUX F, ZHU D, RIVERA MT, BOELAERT M, NEVE J, PERLMUTTER N AND VANDERPAS J. 1998. Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status. *The New England journal of medicine* 339: 1112-1120.
- MORTELLITI MP AND MANNING HL. 2002. Acute respiratory distress syndrome. *American family physician* 65: 1823-1830.
- MOSTERT V, DREHER I, KOHRLE J, WOLFF S AND ABEL J. 2001a. Modulation of selenoprotein P expression by TGF-beta(1) is mediated by Smad proteins. *BioFactors* 14: 135-142.
- MOSTERT V, WOLFF S, DREHER I, KOHRLE J AND ABEL J. 2001b. Identification of an element within the promoter of human selenoprotein P responsive to transforming growth factor-beta. *European journal of biochemistry / FEBS* 268: 6176-6181.
- MUTH OH, OLDFIELD JE, REMMERT LF AND SCHUBERT JR. 1958. Effects of selenium and vitamin E on white muscle disease. *Science* 128: 1090.
- NARANJO-SUAREZ S, CARLSON BA, TSUJI PA, YOO MH, GLADYSHEV VN AND HATFIELD DL. 2012. HIF-independent regulation of thioredoxin reductase 1 contributes to the high levels of reactive oxygen species induced by hypoxia. *PloS one* 7: e30470.
- NOUR M, SCALZO F AND LIEBESKIND DS. 2013. Ischemia-reperfusion injury in stroke. *Interventional neurology* 1: 185-199.
- OLSON GE, WINFREY VP, NAGDAS SK, HILL KE AND BURK RF. 2007. Apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis. *The Journal of biological chemistry* 282: 12290-12297.
- PALIOURA S, HERKEL J, SIMONOVIC M, LOHSE AW AND SOLL D. 2010. Human SepSecS or SLA/LP: selenocysteine formation and autoimmune hepatitis. *Biological chemistry* 391: 771-776.
- PIETSCHMANN N, RIJNTJES E, HOEG A, STOEDTER M, SCHWEIZER U, SEEMANN P AND SCHOMBURG L. 2014. Selenoprotein P is the essential selenium transporter for bones. *Metallomics : integrated biometal science* 6: 1043-1049.
- PITTS MW, REEVES MA, HASHIMOTO AC, OGAWA A, KREMER P, SEALE LA AND BERRY MJ. 2013. Deletion of selenoprotein M leads to obesity without cognitive deficits. *The Journal of biological chemistry* 288: 26121-26134.
- RAYMAN MP. 2005. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *The Proceedings of the Nutrition Society* 64: 527-542.

- REISINGER J, HOLLINGER K, LANG W, STEINER C, WINTER T, WINTER A, MORI M, LINDORFER A, KIBLBOCK D AND SIOSTRZONEK P. 2009. Does early administration of selenium improve neurological outcome after cardiac arrest? *The American journal of emergency medicine* 27: 176-181.
- RENKO K, HOEFIG CS, HILLER F, SCHOMBURG L AND KOHRLE J. 2012. Identification of iopanoic acid as substrate of type 1 deiodinase by a novel nonradioactive iodide-release assay. *Endocrinology* 153: 2506-2513.
- RENKO K, HOFMANN PJ, STOEDTER M, HOLLENBACH B, BEHRENDTS T, KOHRLE J, SCHWEIZER U AND SCHOMBURG L. 2009. Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23: 1758-1765.
- RENKO K, WERNER M, RENNER-MULLER I, COOPER TG, YEUNG CH, HOLLENBACH B, SCHARPF M, KOHRLE J, SCHOMBURG L AND SCHWEIZER U. 2008. Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice. *The Biochemical journal* 409: 741-749.
- RIESE C, MICHAELIS M, MENTRUP B, GOTZ F, KOHRLE J, SCHWEIZER U AND SCHOMBURG L. 2006. Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues. *Endocrinology* 147: 5883-5892.
- ROHWER N, WELZEL M, DASKALOW K, PFANDER D, WIEDENMANN B, DETJEN K AND CRAMER T. 2008. Hypoxia-inducible factor 1alpha mediates anoikis resistance via suppression of alpha5 integrin. *Cancer research* 68: 10113-10120.
- SACCHETTI B ET AL. 2007. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131: 324-336.
- SAITO Y AND TAKAHASHI K. 2002. Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *European journal of biochemistry / FEBS* 269: 5746-5751.
- SCHNEIDER CA, RASBAND WS AND ELICEIRI KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9: 671-675.
- SCHOENMAKERS E ET AL. 2010. Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *The Journal of clinical investigation* 120: 4220-4235.
- SCHOFIELD CJ AND RATCLIFFE PJ. 2004. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature reviews Molecular cell biology* 5: 343-354.
- SCHOMBURG L. 2007. Selenium in intensive care (SIC) study: the XX files are still unresolved. *Critical care medicine* 35: 995-996; author reply 996-997.
- SCHOMBURG L. 2012. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. *Nature reviews Endocrinology* 8: 160-171.
- SCHOMBURG L AND KOHRLE J. 2008. On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. *Molecular nutrition & food research* 52: 1235-1246.
- SCHOMBURG L, RIESE C, MICHAELIS M, GRIEBERT E, KLEIN MO, SAPIN R, SCHWEIZER U AND KOHRLE J. 2006. Synthesis and metabolism of thyroid hormones is preferentially maintained in selenium-deficient transgenic mice. *Endocrinology* 147: 1306-1313.
- SCHOMBURG L, RIESE C, RENKO K AND SCHWEIZER U. 2007. Effect of age on sexually dimorphic selenoprotein expression in mice. *Biological chemistry* 388: 1035-1041.

- SCHOMBURG L AND SCHWEIZER U. 2009. Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium. *Biochimica et biophysica acta* 1790: 1453-1462.
- SCHOMBURG L, SCHWEIZER U, HOLTMANN B, FLOHE L, SENDTNER M AND KOHRLE J. 2003. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *The Biochemical journal* 370: 397-402.
- SCHWARZ K AND FOLTZ CM. 1999. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951. *Nutrition* 15: 255.
- SCHWEIZER U, STRECKFUSS F, PELT P, CARLSON BA, HATFIELD DL, KOHRLE J AND SCHOMBURG L. 2005. Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply. *The Biochemical journal* 386: 221-226.
- SCORTEGAGNA M ET AL. 2003. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nature genetics* 35: 331-340.
- SEALE LA, HASHIMOTO AC, KUROKAWA S, GILMAN CL, SEYEDALI A, BELLINGER FP, RAMAN AV AND BERRY MJ. 2012. Disruption of the selenocysteine lyase-mediated selenium recycling pathway leads to metabolic syndrome in mice. *Molecular and cellular biology* 32: 4141-4154.
- SEEHER S ET AL. 2014a. Secisbp2 is essential for embryonic development and enhances selenoprotein expression. *Antioxidants & redox signaling* 21: 835-849.
- SEEHER S, CARLSON BA, MINIARD AC, WIRTH EK, MAHDI Y, HATFIELD DL, DRISCOLL DM AND SCHWEIZER U. 2014b. Impaired selenoprotein expression in brain triggers striatal neuronal loss leading to co-ordination defects in mice. *The Biochemical journal* 462: 67-75.
- SEILER A ET AL. 2008. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell metabolism* 8: 237-248.
- SEMENZA GL. 1994. Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematology/oncology clinics of North America* 8: 863-884.
- SEMENZA GL. 2007. Life with oxygen. *Science* 318: 62-64.
- SEMENZA GL, ROTH PH, FANG HM AND WANG GL. 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry* 269: 23757-23763.
- SEMENZA GL AND WANG GL. 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* 12: 5447-5454.
- SENGUPTA R AND HOLMGREN A. 2014. Thioredoxin and glutaredoxin-mediated redox regulation of ribonucleotide reductase. *World journal of biological chemistry* 5: 68-74.
- SHETTY SP, SHAH R AND COPELAND PR. 2014. Regulation of selenocysteine incorporation into the selenium transport protein, selenoprotein p. *The Journal of biological chemistry* 289: 25317-25326.
- SHWEIKI D, ITIN A, SOFFER D AND KESHET E. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-845.
- SIMON MC AND KEITH B. 2008. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nature reviews Molecular cell biology* 9: 285-296.
- STAMATI K, MUDERA V AND CHEEMA U. 2011. Evolution of oxygen utilization in multicellular organisms and implications for cell signalling in tissue engineering. *Journal of tissue engineering* 2: 2041731411432365.

- STOCK T AND ROTHER M. 2009. Selenoproteins in Archaea and Gram-positive bacteria. *Biochimica et biophysica acta* 1790: 1520-1532.
- STOEDTER M, RENKO K, HOG A AND SCHOMBURG L. 2010. Selenium controls the sex-specific immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice. *The Biochemical journal* 429: 43-51.
- SWIETACH P, HULIKOVA A, VAUGHAN-JONES RD AND HARRIS AL. 2010. New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation. *Oncogene* 29: 6509-6521.
- TANAKA T AND NANGAKU M. 2013. Angiogenesis and hypoxia in the kidney. *Nature reviews Nephrology* 9: 211-222.
- TIAN JL, ZHANG Y AND CHEN BY. 2010. Sleep apnea hypopnea syndrome and liver injury. *Chinese medical journal* 123: 89-94.
- TOBE R, NARANJO-SUAREZ S, EVERLEY RA, CARLSON BA, TURANOV AA, TSUJI PA, YOO MH, GYGI SP, GLADYSHEV VN AND HATFIELD DL. 2013. High error rates in selenocysteine insertion in mammalian cells treated with the antibiotic doxycycline, chloramphenicol, or geneticin. *The Journal of biological chemistry* 288: 14709-14715.
- TUJEBAJEVA RM, COPELAND PR, XU XM, CARLSON BA, HARNEY JW, DRISCOLL DM, HATFIELD DL AND BERRY MJ. 2000. Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO reports* 1: 158-163.
- TURANOV AA, XU XM, CARLSON BA, YOO MH, GLADYSHEV VN AND HATFIELD DL. 2011. Biosynthesis of selenocysteine, the 21st amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis. *Advances in nutrition* 2: 122-128.
- ULLAH M, HAMOUDA H, STICH S, SITTINGER M AND RINGE J. 2012. A reliable protocol for the isolation of viable, chondrogenically differentiated human mesenchymal stem cells from high-density pellet cultures. *BioResearch open access* 1: 297-305.
- UNIACKE J, HOLTERMAN CE, LACHANCE G, FRANOVIC A, JACOB MD, FABIAN MR, PAYETTE J, HOLCIK M, PAUSE A AND LEE S. 2012. An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature* 486: 126-129.
- URSINI F, HEIM S, KIESS M, MAIORINO M, ROVERI A, WISSING J AND FLOHE L. 1999. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285: 1393-1396.
- URSINI F, MAIORINO M, BRIGELIUS-FLOHE R, AUMANN KD, ROVERI A, SCHOMBURG D AND FLOHE L. 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in enzymology* 252: 38-53.
- WANG N, CHEN Y, YANG X AND JIANG Y. 2014. Selenium-binding protein 1 is associated with the degree of colorectal cancer differentiation and is regulated by histone modification. *Oncology reports* 31: 2506-2514.
- WEIDEMANN A AND JOHNSON RS. 2008. Biology of HIF-1alpha. *Cell death and differentiation* 15: 621-627.
- WIRTH EK, SCHWEIZER U AND KOHRLE J. 2014. Transport of thyroid hormone in brain. *Frontiers in endocrinology* 5: 98.
- WISE DR AND THOMPSON CB. 2010. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends in biochemical sciences* 35: 427-433.
- WONG CH, BOZINOVSKI S, HERTZOG PJ, HICKEY MJ AND CRACK PJ. 2008. Absence of glutathione peroxidase-1 exacerbates cerebral ischemia-reperfusion injury by reducing post-ischemic microvascular perfusion. *Journal of neurochemistry* 107: 241-252.

- XU XM, CARLSON BA, IRONS R, MIX H, ZHONG N, GLADYSHEV VN AND HATFIELD DL. 2007a. Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. *The Biochemical journal* 404: 115-120.
- XU XM, CARLSON BA, MIX H, ZHANG Y, SAIRA K, GLASS RS, BERRY MJ, GLADYSHEV VN AND HATFIELD DL. 2007b. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *PLoS biology* 5: e4.
- YANG WS ET AL. 2014. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* 156: 317-331.
- YE Y, SHIBATA Y, YUN C, RON D AND RAPOPORT TA. 2004. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429: 841-847.
- YUAN J, PALIOURA S, SALAZAR JC, SU D, O'DONOGHUE P, HOHN MJ, CARDOSO AM, WHITMAN WB AND SOLL D. 2006. RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18923-18927.
- ZENG GQ, YI H, ZHANG PF, LI XH, HU R, LI MY, LI C, QU JQ, DENG X AND XIAO ZQ. 2013. The function and significance of SELENBP1 downregulation in human bronchial epithelial carcinogenic process. *PloS one* 8: e71865.
- ZHANG S, LI F, YOUNES M, LIU H, CHEN C AND YAO Q. 2013. Reduced selenium-binding protein 1 in breast cancer correlates with poor survival and resistance to the anti-proliferative effects of selenium. *PloS one* 8: e63702.

6. Danksagung

Das Erstellen dieser Arbeit wäre ohne die Bereitschaft zur Hilfe, Unterstützung und des Nachdenkens von vielen Menschen nicht möglich gewesen.

Großer Dank geht an Prof. Dr. Lutz Schomburg, er war jederzeit Mentor dieser Arbeit. Ich danke ihm für seinen Blick für die Details und auf das große Ganze, die „Unifying Theories“ in Schaubildern gemalt und verworfen, immer ein wenig der Zeit voraus und doch nie genug von dieser um alles zu schaffen was in seinem Geiste an kreativen Ideen schlummert. Es war eine sehr schöne Zeit, die wie im Flug vorbei ging. Lieber Lutz, ich danke dir dafür.

Prof. Dr. Werner Kloas und Prof. Dr. Ulrich Schweizer danke ich sehr herzlich für Interesse, Zeit und die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten. Auch den anderen Mitgliedern der Promotionskommission namentlich, Prof. Dr. Gudrun Brockmann, PD Dr. Ilja Demuth und Prof. Dr. Andreas Plagemann danke ich recht herzlich für ihre Bereitschaft und ihr Interesse. Besonders danke ich Herrn Prof. Thomas Buckhout für den Vorsitz der Promotionskommission.

Herrn Prof Dr. Josef Köhrle, Direktor des Instituts für Experimentelle Endokrinologie und Schirmherr des GRK1208 danke ich sehr herzlich für die über Jahre hinweg begleitende, gute Ausbildung. Er vermochte es in wissenschaftlichen Diskussionen mit einfachen Fragen meine Gedankenbarrieren zu durchbrechen, und die Grenzen des Verstehens weiter zu verschieben. Dafür an dieser Stelle herzlichen Dank.

Die Reisen, Teilnahmen an Konferenzen und vielfältigen Weiterbildungen wären ohne die finanzielle Unterstützung des DFG geförderten Graduiertenkollegs GRK1208 „Hormonal Regulation of Energy Metabolism, Body Weight and Growth“ nicht möglich gewesen.

Bei der Vielzahl von guten Menschen und Wissenschaftlern am Institut für Experimentelle Endokrinologie danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern für die gute Zeit und enge Zusammenarbeit, den wissenschaftlichen Informationsaustausch, das „Wir-Gefühl“ und den Zusammenhalt, in besonderer Weise: Peter Hofmann, Kostja Renko, Waldemar Minich, Eddy Rintjes, Jörg Johannes, Sandra Müller, Eva Wirth, Carola Geiler, Vartiter Seher, Katja Schreiber, Elke Abdel-Karim, Angelika Althaus, Janine Martitz, Mette Stoedter und Thomas Behrends. Auch denen, die nicht aufgezählt sind, sind nicht vergessen oder in Bonn, waren mit im GRK und haben die Fahrten nach Bregenz zu einem Highlight gemacht. Auch ihnen gilt mein Dank.

Die klinische Studie wäre ohne Malte Cremer, Lennart Wiehe und Monika Wiśniewska, den Kollegen der Labor Berlin GmbH und der Einwilligung der Eltern der Probanden nicht möglich gewesen. Auch ihnen allen gilt mein herzlicher Dank.

Herrn Prof. Dr. Thorsten Cramer danke ich für die materielle und intellektuelle Unterstützung bei der Durchführung von Hypoxie Versuchen und der Diskussion und Interpretation. Allen Kollaborateuren der LMU München, insbesondere Dr. Viktoria Bogner danke ich für die Zusammenarbeit bei der Polytraumastudie. Außerdem danke ich allen anderen Wissenschaftlern, die durch Bereitstellung von Plasmiden, Chemikalien und Wissen über Experimente zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. An dieser Stelle sei auch Lüder Wiebusch und Oliver Winter für wissenschaftliche Gespräche während und nach der Arbeit beim Mittagessen und am Kanal gedankt.

Auch der Technologietransferstelle der Charité – Universitätsmedizin Berlin danke ich für das Gutachten unserer Erfindungen.

Bis hierhin wäre nichts möglich gewesen ohne die nimmer müde Unterstützung meiner Familie in besonderer Weise Anna, Jannes, Kaspar und Franka. Es bleibt die vom Herzen ausstrahlende Vorfreude auf den weiteren gemeinsamen Weg.

7. Publikationsliste, Vorträge, Studienkoordination, Erfindungen und Auszeichnungen

7.1 Publikationen während der Promotion

BECKER NP, MARTITZ J, RENKO K, STOEDTER M, HYBSIER S, CRAMER T AND SCHOMBURG L. 2014. Hypoxia reduces and redirects selenoprotein biosynthesis. *Metallomics* : 1079-1086.

FRADEJAS N, CARLSON BA, RIJNTJES E, **BECKER NP**, TOBE R AND SCHWEIZER U. 2013. Mammalian Trit1 is a tRNA([Ser]Sec)-isopentenyl transferase required for full selenoprotein expression. *The Biochemical journal* 450: 427-432.

HUGHES DJ... **BECKER NP**.... ET AL. 2014. Selenium status is associated with colorectal cancer risk in the European prospective investigation of cancer and nutrition cohort. *International journal of cancer Journal international du cancer*.

STOEDTER M, RENKO K, IBANEZ E, PLANO D, **BECKER NP**, MARTITZ J, PALOP A, CALVO A, SABNARTIN C AND SCHOMBURG L. 2015. Strong induction of iodothyronine deiodinases by chemotherapeutic selenocompounds, *Metallomics* accepted

MARTITZ J, **BECKER NP**, RENKO K, STOEDTER M, HYBSIER S, AND SCHOMBURG L. 2015. Gene-specific regulation of selenoprotein expression in human liver cells by interleukin-6, *Metallomics*, Mauskript in finaler interner Revision

RENKO K, BOTH S, HOEFIG CS, WELSINK T, SCHWIEBERT C, BRAUN D, **BECKER NP**, KOEHRLE J AND SCHOMBURG L. 2015. An improved non-radioactive screening method identifies genistein and xanthohumol as potent 1 inhibitors of iodothyronine deiodinases, *Thyroid*, accepted

7.2 Abstracts auf internationalen Konferenzen

Trit1 tRNA[Ser]Sec-isopentenyl-transferase

Fradejas Villar N.1, Carlson B.A.2, Rijntjes E.3, Becker N.-P.3, Tobe R.2, Schweizer U.1
1Institut für Biochemie und Molekularbiologie Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, Germany, 2Molecular Biology of Selenium Section, Laboratory of Cancer Prevention, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, United States, 3Institut für Experimentelle Endokrinologie Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany
10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine 2013, Berlin

Hypoxia affects selenoprotein expression

Becker N.-P.1, Stoedter M.1, Martitz J.1, Renko K.1, Schomburg L.1
1Charité - Universitätsmedizin Berlin, Institute for Experimental Endocrinology, Berlin, Germany
10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine 2013, Berlin

Selenoprotein S is expressed from two alternatively spliced functional transcript variants

*Stoedter M.1, **Becker N.-P.1**, Schomburg L.1* 1Charité - Universitätsmedizin Berlin, Institute for Experimental Endocrinology, Berlin, Germany
10th International Symposium on Seleniumin Biology and Medicine 2013, Berlin

A non-radioactive assay to determine the enzymatic activities of deiodinase isozymes

*Renko K.1, Höfig C.S.2, Both S.2, **Becker N.-P.2**, Welsink T.3, Köhrle J.2, Schomburg L.2*
1Charité Universitätsmedizin, Berlin, Germany, 2Charité - Universitätsmedizin Berlin/Institut für Experimentelle Endokrinologie, Berlin, Germany, 3InVivo Biotech Services GmbH, Hennigsdorf, Germany
10th International Symposium on Seleniumin Biology and Medicine 2013, Berlin

Regulation of selenoprotein expression by Interleukin-6

*Martitz J.1, **Becker N.-P.1**, Schomburg L.1*
1Institute for Experimental Endocrinology, Charité - Universitätsmedizin, Berlin, Germany
10th International Symposium on Seleniumin Biology and Medicine 2013, Berlin

Effects of aminoglycoside antibiotics on selenoprotein P biosynthesis

*Renko K.1, Voss L.1, **Becker N.-P.1**, Heynisch B.1, Schomburg L.1* 1
Charité - Universitätsmedizin Berlin/Institut für Experimentelle Endokrinologie, Berlin, Germany
10th International Symposium on Seleniumin Biology and Medicine 2013, Berlin

Gene-specific regulation of selenoproteins by methyl-imidoselenocarbamates with antitumor activity

*Stoedter M.1, Ibáñez E.2, Renko K.1, **Becker N.-P.1**, Martitz J.1, Rijntjes E.1, Calvo A.3, Palop J.2, Sanmartín C.2, Schomburg L.1*
1Charité - Universitätsmedizin Berlin, Institute for Experimental Endocrinology, Berlin, Germany, 2University of Navarra, Synthesis Section, Department of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Pamplona, Spain, 3University of Navarra, Oncology Division, Center for Applied Medical Research, Pamplona, Spain
10th International Symposium on Seleniumin Biology and Medicine 2013, Berlin

Effects of a congenital cytomegalovirus infection on the selenium status of mothers and neonates

*Wiehe L.1, Scharpf M.2, **Becker N.-P.1**, Abele H.3, Hamprecht K.4, Schomburg L.1*
1Charité Universitätsmedizin, Institut für experimentelle Endokrinologie, Berlin, Germany, 2Universitätsklinikum Tübingen, Institut für Pathologie und Neuropathologie, Tübingen, Germany, 3Universitätsklinikum Tübingen, Universitäts-Frauenklinik, Tübingen, Germany, 4Universitätsklinikum Tübingen, Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankeheiten, Tübingen, Germany
10th International Symposium on Seleniumin Biology and Medicine 2013, Berlin

Gender differences in selenoprotein and miRNA profiles during the acute phase response

N.-P. Becker¹, M. Stoedter¹, K. Renko¹, L. Schomburg¹
1 Charité - Universitätsmedizin Berlin, Institute for Experimental Endocrinology, Berlin, DGZ Meeting „RNA and disease“, Jena, 2011

Biosynthesis of Selenoprotein S (SELS) and P (SePP) are interconnected by the endoplasmic reticulum

N.-P. Becker, M. Stoedter, K. Schreiber, L. Schomburg

Charité - Universitätsmedizin Berlin, Institute for Experimental Endocrinology, Berlin, Germany,
Bregenz, ESE Bregenz Summer School on Endocrinology, 2012

Selenium and hypoxia in mesenchymal stromal cells – who is driving gene expression?

N.-P. Becker¹, S. Geißler², L. Schomburg¹

¹Institut für Experimentelle Endokrinologie; ²Julius Wolff Institut & Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT) Charité - Universitätsmedizin Berlin; CVK; Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin

Bregenz, ESE Bregenz Summer School on Endocrinology, 2013

7.3 Vorträge auf nationalen und internationalen Konferenzen

„Hypoxia affects selenoprotein expression“

Niels-Peter Becker,

10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine 2013, Berlin Germany

„Molecular Regulation of Selenoprotein Expression by Local Factors“

N.-P. Becker, J. Martitz & L. Schomburg,

3rd International Conference on Selenium in the Environment and Human Health 2013, Hefei China

„TXRF – Anwendungen für Klinik und Wissenschaft“

N.-P. Becker,

6. Magdeburger TXRF- Workshop, 2012

7.4 Klinische Studie:

„Selen und Schilddrüsenhormone bei Neugeborenen mit klinischer Sepsis“

Antragsnummer: EA2/092/12

Studienleiter: Prof. Dr. Lutz Schomburg, **Niels-Peter Becker**, Dr. Malte Cremer

7.5 Erfindungen während der Promotion

Patenteinreichungen:

„Identification of modulators of binding properties of antibodies reactive with a member of the cardiac receptor family“

Erfinder: **Niels-Peter Becker**, Waldemar Minich, Lutz Schomburg;

Patentinhaber: Charité – Universitätsmedizin Berlin; DE 102014226663.7

Erfindungen angenommen durch die Technologietransferstelle der Charité – Universitätsmedizin Berlin:

CH703 „autoAB-Assays für Fetuine“

Erfinder: **Niels-Peter Becker** und Lutz Schomburg

CH707 „autoAB-Assays für Myostatin“

Erfinder: **Niels-Peter Becker**, Wolfgang Döhner, Lutz Schomburg

CH708 „autoAB-Assays für Gewichts-relevante Hormone und -Rezeptoren“

Erfinder: **Niels-Peter Becker** und Lutz Schomburg

7.6 Preise während der Promotion:

Bester Studentenvortrag der „3rd International Conference on Selenium in the Environment and Human Health“ in Hefei, China, 2013

Posterpreis auf der GMS (Gesellschaft für Mineral und Spurenelemente) Tagung in Berlin 2013

8. Anhang

8.1 Rezepte

RIPA Puffer

25mM Tris-HCl (pH 7.6),
150mM NaCl,
1% NP-40,
1% sodium deoxycholate,
0.1% SDS

Puffer 1

50mM Tris-HCl (pH 7.5)
10mM EDTA (pH 8.0)
100µg/ml RNase A

Puffer 2

2M NaOH
1% SDS

Puffer 3

4.09M guanidine hydrochloride (pH 4.2)
759mM potassium acetate
2.12M glacial acetic acid

Homogenisationspuffer

20 mM HEPES;
250 mM Saccharose;
1 mM EDTA;
optional 1 mM DTT;
pH 7,4

4xProbenpuffer

200 mM Tris (pH 7,5);
50% Glycerin; 4% SDS;
0,04% Bromphenolblau;
50 mM DTT

PonceauS-Lsg.

0,1% PonceauS;
3% TCA;
3% Sulfosalicylsäure

Sammelgel (5%) i.e. 5 mL

H ₂ O	3,4 ml
30% acryl-bisacrylamide mix	0,83 ml
1,5 M Tris (pH 6.8)	0,63 ml
10% SDS	0,05 mL
10% ammonium persulfate	0,05 mL
TEMED	0,005 mL

Trenngel (10%) i.e. 10 mL

H ₂ O	4,0 mL
30% acryl-bisacrylamide mix	3.3 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 mL
10% SDS	0.1 mL
10% Ammonium persulfate	0.1 mL
TEMED	0,004 mL

Laufpuffer 10x

1,92 M Glycin (288g/2L)
0,25 M Tris (60,6g/2L)
1% SDS (20g/2L)

Transferpuffer 10x

250 mM Tris (30,3g/L)
1,5 M Glycin (112,5 g/l)
→ 100 mL 10x Transferpuffer + 100 mL Methanol+ 800 mL H₂O

TBS-T Puffer 10x pH8,0

250 mM TRIS (33 g/L)
1,25 M NaCl (73 g/L)
3 % Tween (30 g/L)

SEAP Puffer

100 nM Tris pH 10
50 mM NaCl
5 mM Magnesium

1:10 mit SEAP Substrat (Applied Biosystems) vermischen

9. Primer

9.1 Klonierungs Primer

Promoter	Fw 5'-3'	Rv 5'-3'
SPHS2	atgggtaccTGTGGTGGCTTATGCCTGTA	atggctagcGCTACTCAAGCCGTCAGACC
PSTK	atgggtaccTGCTCTTCACCTTCAGTCCAAA	atggctagcAATAGAAGGCGAGGCTGACA
SelenBP1	atgggtaccCACCCAGAGCTTTTATCCA	atggctagcTGCCGACTGGTACACTTTGA
TR1	atgggtaccCCAGTAGCTCTAGTGGATGGA	atggctagcACAAGGCCCTGTGGGAAC
DIO1	atgggtaccCCGCCTCTGGACTTCATTTA	atggctagcCTCGCAAAGCCAGAGTAAG
DIO2	atgggtaccAGGCAATTGAAAATGCATCC	atggctagcGAAGCATCCAGCACTGAAGA
SEPSECS	atgggtaccTTGGTATGCGGGACCTAAAG	atggctagcACGGAACCAGAATGCAACTC
GPX2	atgggtaccTTAGCAGATGTCCTGCGATG	atggctagcCCCCACCTGTAAGTGCTGTT
SELK	atgctcgagTTTCAAAGAGATGACACATGG	atggatgcGTCCCACTTCCCCGCTTC
SEPP	atgctcgagAGATATGGGACCCCAAAAGG	atggatgcAGTCCTGTTGTTTACCTCACC

9.2 RT-PCR Primer

Gene	Fw 5'-3'	Rv 5'-3'
18S rRNA	TTGACGGAAGGGCACCACCAG	GCACCACCACCCACGGAATCG
LRP1	AACAATGGCAGATGTATCAACA	TTGAACTGGGTGCTAGAACAG
LRP2	TGATATCGAAGCGTGTTTACTG	TAAGCTTACTCCAAAGGGATGA
LRP8	GAGATGGACCTACTGACCAAGA	GGTAGGAGAGGTCACACCAGTA
FABP1	AAGTGATCCAAAACGAATTCAC	CATGGTATTGGTGATTATGTCTG
SelenBP1	CCAAAGCTGCACAAGGTC	GTCCCCCTTCACCTCGAAC
GSR	TGACAAGGGTCATATCATCGTA	ACCACAGTTGGGATGTTGTTAT
PGK1	GTTCTTGAAGGACTGTGTAGGC	AAGCTCGGAAAGCTTCTATTTT
CA9	GGAAGAAAACAGTGCCTATGAG	AGAGACCCCTCATATTGGAAGT
SePP	TATGATAGATGTGGCCGTCTTG	TGTGATGATGCTCATGATGGTA
SelS	TGCTGTGGAACCTGATGTTG	TTCTGTCCGATTTCCGTTTC
GPX2	CCAATTTGGACATCAGGAGAA	CTCAAAGTTCCAGGCCACAT
SelN	CCATCAGCGACTTCTACTACACTG	ACTCCATGTCCACATTCAGAGAC
SelK	TTGTTTTTCAAACCTCTGCTTCAG	AGAGCAGACATTTACCTTCCTCAT
SEPHS2	TAACGCCACTCATGGTCAAA	GGGTTCCCTAACGGTTTGGTT
SBP2	CAGTTCAAGAGCCTCCAAGG	CATGCTGAGAGTGCTGCTTC
PSTK	CACTGCTTTGGAAAATCCAG	TTCGCTCTTACCCATCTTTG
SCLY	TGGGGCACAAGTTTTATGGT	CCTCATAAGCCTCGCAGTTC
SEPSECS	AAAGCTGTCACTCAGCTTGG	GATGCAGCATTGAGGTAAGC
hGPX1	GGGCAAGGTACTACTTATCGAG	TTCAGAATCTCTTCGTTCTTGG
hGPX3	CCGGGGACAAGAGAAGTC	GCTTGAAGGGGATGTACT
hGPX4	GCTGTGGAAGTGGATGAAGA	CTAGAAATAGTGGGGCAGGTC
DIO1	GGTGCAACATTTGGGAGTTTAT	TGGTGATTTCTGATGTCCATGT
DIO2	CTATGACTCGGTCATTCTGCTC	CTTCTGTACTGGAGACATGCAC
DIO3	GCTTCCAGAGCCAGCACATC	GCTGCCGAAATTGAGAACCA
hSEP15	CTTGTGATCTTCTCGGACAGTT	CACTCCTAACAAAAGCTTGGAC
hSELH	GTAGCCGAGAAGCGAGAGA	TTCACCTTTACTGGAAGCTCTG
hSELI	AATGGCATACTTTGATCCTGAC	GTAGGCTACGAAGTTGAGGATG
hSELM	GACAGCTGAACCGCCTAA	CACTAGCGCATTGATCTCTTC
hSELO	GATGGTAATCCCAAATATGAACA	TGCTCATCTGCAGACTTAAAAA
hSELT	GCTTCTGCTGCTTCTCCTAGT	TAATAACCCGCATGTACTCCTC
hTR1	GCTAAAGATCATCACCTGGTA	CAAGCACAAAATAAGGAACACA
hTR2	AAAGGTGGGAAAGAGATTCTG	TCACTTGTGATTCCATATTCCA
hTR3	GCTAAATCCACTGAAGGAACAG	ATCTTCTCCAAGCCTATTTTCC
hSELV	CCTACTCTTTGAGGAGGACAGA	GGCTACCTTTTCTTGATTTCCT
hSELW	CGGGAAGTTGATTCACTCTAAG	CACAAGACTTTTCAGTCCTTCC
hSEPX1	TTTTCCAGAATCACTTTGAACC	AGGCTTCAGATCTATTGTGCTC
eEFSec	CGAGGTGCACCGATTATACC	TTGGCCTTTGATGGAGAAAC

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titele „Sauerstoffabhängige Regulation der Selenoproteinbiosynthese“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Des Weiteren erkläre ich von der dem angestrebten Verfahren zugrunde liegenden Promotions-Verordnung Kenntnis genommen zu haben. Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit weder in dieser noch einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe und dass ich nicht im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades bin.

Berlin, den 31.01.2015

Niels-Peter Becker